

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie,
Molekulare Diagnostik
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Harald Renz
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Entwicklung eines Westernblot-Testsystems
zur Detektion der
humanen Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-Bet**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
doctor medicinae (Dr. med.)

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Lukas Scheffer
aus Kassel

Marburg,
2018

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

23.08.2018

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches.

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. Schäfer

Referent: Prof. Dr. rer. nat. H. Garn

Korreferentin: PD Dr. rer. nat. B. Fritz

1	Einleitung	1
1.1	Asthma	1
1.1.1	Klinische Ausprägung von Asthma bronchiale	1
1.1.2	Therapie	2
1.1.3	Epidemiologie	2
1.1.3.1	Die Hygienehypothese	3
1.1.4	Klassifikationen von Asthma bronchiale	4
1.1.5	Pathophysiologie	6
1.2	T _h -Zellen	7
1.2.1	Differenzierung von T _h 1-Zellen	8
1.2.2	Differenzierung von T _h 2-Zellen	9
1.3	Transkriptionsfaktoren der T _h -Differenzierung	10
1.4	Hypothesen und Zielsetzung der Arbeit	12
2	Material & Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1	Antikörper	21
2.1.2	Proben	27
2.2	Methoden	28
2.2.1	Westernblot	28
2.2.2	Coomassie-Brillant-Blau-Färbung	29
2.2.3	Antikörperfärbung und Detektion	30
3	Ergebnisse	32
3.1	Nachweis der rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet	33
3.1.1	Coomassie-Brillant-Blau-Färbung	33
3.1.2	Nachweis der rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet mit polyklonalen Antikörpern	34

Inhaltsverzeichnis

3.1.3	Nachweis der rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet mit monoklonalen Maus-Antikörpern	36
3.1.4	Nachweis der rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet mit monoklonalen Maus Antikörpern unter Variation des 2. Antikörpers	38
3.1.5	Nachweis der rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet mit HRP konjugierten monoklonalen Maus-Antikörpern	40
3.2	Sensitivitäts- und Spezifitätsprüfung der monoklonalen Maus-Antikörper	41
3.2.1	Nachweis der rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet unterschiedlicher Hersteller mit monoklonalen Maus-Antikörpern	41
3.2.2	Kreuzreaktivitätsexperiment der monoklonalen Maus-Antikörper	44
3.3	Nachweis von GATA-3 und T-Bet in humanen Vollblutproben	47
3.3.1	Nachweis von GATA-3 und T-Bet in humanem Vollblut mit dem polyklonalen Antikörper-System	47
3.3.2	Spike-Experiment für GATA-3 und T-Bet	48
3.3.3	Anwendung von Pre-pRaM-HRP auf humanes Vollblut	51
3.3.4	Nachweis von GATA-3 und T-Bet in humanem Vollblut mit monoklonalen Maus-Antikörpern und Pre-pRaM-HRP	53
3.3.5	Nachweis von GATA-3 und T-Bet in humanem Vollblut mit monoklonalen Maus-Antikörpern und Pre-pGaM-κ-HRP	57
3.3.6	Nachweis von GATA-3 und T-Bet in humanem Vollblut mit HRP konjugierten monoklonalen Maus-Antikörpern	58
4	Diskussion	60
4.1	Methodik	61
4.2	Ausblick	67
5	Literaturverzeichnis	74

Inhaltsverzeichnis

6	Abkürzungsverzeichnis	93
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	96
7.1	Abbildungsverzeichnis	96
7.2	Tabellenverzeichnis	97
8	Zusammenfassung	98
9	Abstract	100
10	Verzeichnis der akademischen Lehrer	102
12	Danksagung	104

1 Einleitung

1.1 Asthma

Asthma ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege, deren klinisches Erscheinungsbild durch variable Atemwegsobstruktion aufgrund einer bronchialen Hyperreagibilität bedingt ist (Bundesärztekammer et al., 2009) und deren Entwicklung auf ein komplexes Zusammenspiel von genetischen und Umweltfaktoren beruht (Robert Koch Institut (Hrsg), 2015). Bei langfristig bestehendem Asthma bronchiale, meist in Kombination mit ungenügender Therapie, kann sich die initial reversible Obstruktion fixieren. Man spricht in diesem Zusammenhang von Atemwegs-Remodeling (Global Initiative for Asthma (GINA), 2017).

1.1.1 Klinische Ausprägung von Asthma bronchiale

Die Erkrankung Asthma bronchiale ist durch eine anfallsartige Verengung des Bronchialsystems, häufig nachts, mit einhergehender Luftnot/Atemnot, Brustenge, Husten und einem expiratorisch giemendem Atemgeräusch gekennzeichnet. Auslösend für die klinische Symptomatik des Asthma bronchiale können der Kontakt mit Allergenen oder virale Infekte, aber auch inhalative Reizstoffe wie zum Beispiel Zigarettenrauch, Schwefeldioxid, Ozon und weitere Noxen sowie kalte Luft, Stress und psychische oder auch physische Belastung sein (Hallstrand et al., 2005; Jackson et al., 2008; Tatum et al., 2005; Weinberger, 2003). Der Schweregrad des Anfalls entscheidet über die sich anschließenden therapeutischen Maßnahmen. Leicht- bis mittelschwere Anfälle können bei gutem Ansprechen der Therapie ambulant behandelt werden. Schwere Anfälle, einhergehend mit hoher Atemfrequenz ($\geq 25/\text{Minute (min)}$), hoher Herzfrequenz ($\geq 110/\text{min}$) und einer unter 50% des Normalwertes gefallen maximalen Flussgeschwindigkeit der Ausatemluft sollten stationär behandelt werden. Lebensbedrohliche Asthmaanfälle zeichnen sich durch eine obstruktiv bedingte frustrane Atemarbeit, eine Zyanose und ein Kreislaufversagen mit Bradykardie und Hypotension bis hin zum Koma aus. In solchen Fällen kann neben der intensiven supportiven und medikamentösen Therapie auch die Intubation und

Beatmung sowie die Betreuung des Patienten auf der Intensivstation notwendig sein (Bundesärztekammer et al., 2009).

1.1.2 Therapie

Das momentane Therapiekonzept von Asthma bronchiale basiert hauptsächlich auf dem Konzept der Symptomkontrolle. Darunter fällt zum einen die Kontrolle der aktuellen Beschwerden und zum anderen die Risikominimierung für die weitere Verschlechterung oder das Auftreten akuter Anfälle. Abhängig vom Asthmaschweregrad werden die Patienten mit einer Kombination aus wenigen unterschiedlichen Medikamenten therapiert. Hierzu zählt bei allen Patienten die situative Einnahme eines inhalativen kurzwirksamen β 2-Sympathomimetikums und bei zunehmendem Schweregrad wird als Dauertherapie mit einer Kombination aus langwirksamen β 2-Sympathomimetika und inhalativen Glucocorticoiden in aufsteigender Dosierung therapiert. Zusätzliche Wirkstoffgruppen sind Leukotrien-Rezeptor-Antagonisten, Parasympatholytika und in Ausnahmefällen sogenannte Biologicals wie zum Beispiel Anti-Immunglobulin (Ig) E- und Anti-Interleukin (IL) 5-Antikörper (Global Initiative for Asthma (GINA), 2017). Die Tatsache, dass in den letzten Jahrzehnten nur sehr wenig neue Medikamente ihren Weg in die Leitlinien gefunden haben, liegt unter anderem an der vielschichtigen und heterogenen Pathophysiologie der Erkrankung Asthma bronchiale und der damit verbundenen Schwierigkeit die geeignete Patientenuntergruppe für ein neues Therapiekonzept ausfindig zu machen.

1.1.3 Epidemiologie

Epidemiologische Studien konnten zeigen, dass es in den letzten Jahrzehnten zu einem weltweiten Anstieg von allergischen Erkrankungen gekommen ist (Asher et al., 2006). Mit schätzungsweise ca. 300 Millionen Erkrankten zählt Asthma bronchiale zu einer der bedeutendsten Volkskrankheiten weltweit (World Health Organization (WHO), 2007). Insbesondere ist eine Zunahme der Prävalenz von Asthma bronchiale im Kindesalter zu beobachten (Mallol et al., 2013), wobei die Summe der vorliegenden Daten für das Erreichen eines

Plateaus sprechen (H. R. Anderson et al., 2007). Es wird geschätzt, dass in Deutschland ca. 20 bis 30 Millionen Menschen von allergischen Krankheiten betroffen sind (Ring et al., 2010). Eine so hohe Anzahl von Erkrankten spiegelt sich auch in der sozioökonomischen Belastung des Landes wieder. Die durch das Statistische Bundesamt ermittelten Krankheitskosten für Asthma bronchiale im Jahr 2015 lagen bei ca. 1,8 Milliarden Euro (Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2018). Weltweit betrachtet zeigen sich jedoch Unterschiede in der Zunahme der Prävalenz, bzw. nach einem signifikanten Anstieg in den letzten Jahrzehnten scheint es in manchen Ländern zu annähernd gleichbleibenden Prävalenzen zu kommen. Eine vormals niedrigere Prävalenz in sogenannten „Schwellenländern“ im Vergleich zu „industrialisierten Ländern“ scheint sich zunehmend anzugleichen. Diese Angleichung der Prävalenzen lässt sich aufgrund der geringen zeitlichen Komponente nicht mit genetischen Veränderungen der Populationen ausreichend erklären. Vielmehr scheinen externe Faktoren der Lebensumstände einen Einfluss auszuüben (Mallol et al., 2013; Von Mutius, 2010).

1.1.3.1 Die Hygienehypothese

Als Erklärungsansatz für die aus epidemiologischen Studien gewonnenen Ergebnisse wurde Ende der 80er Jahre die Hygienehypothese formuliert. Hiermit war ursprünglich gemeint, dass der potentiell infektiöse Kontakt mit Familienangehörigen, insbesondere älteren Geschwistern, während der Kindheit der Entstehung von allergischen Erkrankungen vorbeuge (Strachan, 1989). Trotz der teilweise widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich des Einflusses von einzelnen Mikroorganismen in der Kindheit auf die Entstehung von atopischen Erkrankung (El-Zein et al., 2010; Linneberg et al., 2003), konnte der protektive Effekt von niedrigeren hygienischen Standards und der höhere Kontakt mit mikrobiellen Komponenten im Rahmen eines landwirtschaftlichen Umfelds in den ersten 5 Lebensjahren nachgewiesen werden (Riedler et al., 2001). Untersuchungen zwischen unterschiedlichen sozi-ökonomischen Bevölkerungsgruppen, wie zum Beispiel der Vergleich von Ost- und Westdeutschland sowie zwischen städtischer und ländlicher Bevölkerung, belegen diese Annahme und bekräftigen die Hygienehypothese (Braun-

Fahrländer et al., 1999; Heinrich et al., 2002; T Nicolai et al., 1997; Thomas Nicolai et al., 1996). Umgekehrt formuliert kann somit der zunehmende Hygienestandard und die damit einhergehende relative Sterilisation der Umwelt als Ursache für die Zunahme von Krankheiten des atopischen Formenkreises, insbesondere allergischer Erkrankungen, angesehen werden.

1.1.4 Klassifikationen von Asthma bronchiale

Obwohl die Hygienehypothese ein plausibler Erklärungsansatz für die steigende Zahl der Asthmapatienten ist, sind nicht alle an Asthma bronchiale erkrankten Patienten dem atopischen Formenkreis zuzuordnen. Schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts begann man damit, das Kollektiv der an Asthma bronchiale erkrankten Patienten in unterschiedlich definierte Patientengruppen zu unterteilen. Eine grobe Einteilung bezüglich der damaligen Kriterien ist die Unterteilung in nicht allergisches (intrinsic) und exogen-allergisches (extrinsic) Asthma bronchiale (Rackemann, 1918, 1947). Die nicht allergische, intrinsische Form des Asthma bronchiale wurde mit vielen auslösenden Faktoren in Verbindung gebracht. In vielen Fällen spielte als Ursache virale Infekte der Atemwege und eine sich anschließende, eventuell autoimmunologische Reaktion der Lunge eine Rolle. Exogen-allergisches, bzw. extrinsisches Asthma bronchiale beruht auf einer IgE-vermittelten Sofortreaktion und anschließende zelluläre Spätreaktion der Bronchien auf exogene Pathogene, bzw. Allergene (Rackemann, 1918; Walker et al., 1991). Die Immunantwort richtet sich dabei gegen eine Vielzahl von prinzipiell nicht pathogenen Strukturen. Hierzu zählen unter anderem Gräser- und Blütenpollen, Hausstaubmilben, Tierepithelien, Stäube oder auch Schimmelpilze. Bei Patienten mit dieser Krankheitsausprägung ist meist eine atopische Prädisposition zu finden (Garn et al., 2007).

Genauer betrachtet, handelt es sich bei den Ausprägungen von intrinsischem und extrinsischem Asthma bronchiale um sogenannte Phänotypen. Ein Phänotyp bezieht sich auf klinisch relevante und messbare Ausprägungen einer Erkrankung ohne die ätiologischen oder pathophysiologischen Mechanismen mit einzubeziehen. Ein Phänotyp ergibt sich aus dem Wechselspiel zwischen genetischer Prädisposition des Patienten und Umwelteinflüssen (Ciprandi et al.,

2017). Unterschiedlichste Charakteristika wurden im Laufe der Zeit zur Phänotypisierung von Asthma bronchiale herangezogen. Eine der aktuellsten und am ehesten Praxis orientierten Einteilung bezieht sich auf den Asthmaschweregrad und die Symptomkontrolle (Global Initiative for Asthma (GINA), 2017).

Die Tatsache, dass es sich bei Asthma um eine chronisch entzündliche Erkrankung handelt spiegelt sich zum einen in dem oben beschriebenen Therapieansatz mit Glucocorticoiden wieder, zum anderen auch in der vom vorherrschenden Entzündungsmechanismus abhängigen phänotypischen Einteilung von eosinophilem und nicht-eosinophilem Asthma bronchiale (Sally E Wenzel, 2006). Diese Phänotypisierung auf Grundlage des vorherrschenden Entzündungsmusters konnte auf 4 Typen ausgeweitet werden: eosinophiles-, neutrophiles-, gemischt granulozytäres- und pauci-granulozytäres-Asthma (Simpson et al., 2006). Als Basis für die unterschiedlichen zellulären Entzündungsphänotypen wurden drei grundlegende immunologische Mechanismen definiert: Typ 1 (T-Helfer-Zellen Typ 1 (T_H1) getrieben), Typ 2 (T-Helfer-Zellen Typ 2 (T_H2) verursacht) und Typ 3 (T-Helfer-Zellen Typ 17 (T_H17) vermittelt) (Annunziato et al., 2015). Jeder dieser drei Typen besteht jeweils aus einer Gruppe von mechanistisch sich gegenseitig beeinflussenden Zellen und Zytokinen. Typ 1 umfasst unter anderem T_H1 -Zellen, Cluster of Differentiation (CD) 8^+ -T-Zellen und natürliche Killerzellen, welche ihre Aktivität gegen intrazelluläre Pathogene richten. Mit dem Typ 2 verbundene Aktivität richtet sich gegen Parasiten und wird durch das Zusammenspiel von T_H2 -Zellen, B-Zellen und eosinophilen Granulozyten vermittelt. Der maßgeblich durch T_H17 -Zellen bestimmte Typ 3 richtet sich gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze.

Eine durch Desai und Oppenheimer auf Grundlage der oben genannten immunologischen Mechanismen aufgestellte Klassifikation der Asthmaphänotypen beruht auf der Unterteilung von T_H2 vermittelten Asthma und Nicht- T_H2 vermitteltem Asthma. Zum T_H2 vermittelten Asthma gehört das „early-onset allergic T_H2 asthma“, das „late-onset persistent eosinophilic asthma“, die „allergic bronchopulmonary mycoses“ und das „exercise-induced asthma“. Das Nicht- T_H2 Asthma besteht aus den Untergruppen „neutrophilic asthma“ und „extensive remodelling asthma“ (I. Agache et al., 2012; Desai et al., 2016; Lötvall et al., 2011).

Verschiedenen T-Helfer-Zell (T_H -Zell) -Populationen der Patienten, insbesondere den sich gegenseitig beeinflussenden T_H1 - und T_H2 -Zellen, ist somit eine tragende Rolle in den pathophysiologischen Mechanismen der Erkrankung Asthma bronchiale zuzuschreiben.

1.1.5 Pathophysiologie

Die in ihrer klinischen Ausprägung stark variable Erkrankung Asthma bronchiale lässt sich pathophysiologisch auf drei wesentliche Mechanismen reduzieren. Erstens eine chronische bronchiale Entzündung ($T2^{\text{HIGH}}$ oder $T2^{\text{LOW}}$ vermittelt), zweitens eine bronchiale Hyperreagibilität und drittens die symptomgebende Komponente der bronchialen Obstruktion. Verantwortlich für die bronchiale Obstruktion sind ein Bronchospasmus der glatten Bronchialmuskulatur, ein Ödem der Bronchialschleimhaut und eine Hyper- bzw. Dyskrinie. Bei Patienten mit einer langen Krankheitsgeschichte bzw. mangelhaft therapiertem Asthma bronchiale kann sich eine dauerhafte bronchiale Obstruktion als Folge des Atemwegs-Remodeling im Zuge der andauernden Inflammation entwickeln (Global Initiative for Asthma (GINA), 2017; Russell et al., 2017; Wäsche et al., 2016). Zur den pathophysiologischen Vorgängen des Atemwegs-Remodeling zählen die Becherzellhyperplasie, eine Basalmembranverdickung, epitheliale Zellveränderungen, Hypertrophie der glatten Bronchialmuskulatur und der Submucosa sowie vermehrte Infiltration von Mastzellen in die glatte Bronchialmuskulatur (Berair et al., 2014; Sutcliffe et al., 2012; Wardlaw et al., 2000). Sowohl der Vorgang des vermehrten Atemwegs-Remodeling als auch die bronchiale Hyperreagibilität werden von den pathophysiologischen Vorgängen der chronisch bronchialen Entzündung im Sinne einer $T2^{\text{HIGH}}$ - oder $T2^{\text{LOW}}$ -Entzündungsreaktion beeinflusst (Russell et al., 2017).

Das charakteristische Merkmal der $T2^{\text{HIGH}}$ -Entzündungsreaktion ist eine starke Polarisierung hin zur T_H2 -Zelle. Ausdruck dieser Dominanz ist eine Eosinophilie und für T_H2 -Zellen typisches Interleukinmilieu (IL-4, IL-5 und IL-13). Im Gegensatz zur $T2^{\text{HIGH}}$ -Entzündungsreaktion sind T_H1 - und T_H17 -Zellen die Grundlage der $T2^{\text{LOW}}$ -Entzündungsreaktion. Häufig ist dieser Entzündungstyp mit einer Neutrophilie vergesellschaftet. (Chung et al., 2014; Douwes et al., 2002;

Eltboli et al., 2013; R. Green et al., 2002; McGrath et al., 2012; S E Wenzel et al., 1999).

Eine eosinophile $T2^{\text{HIGH}}$ -Entzündungsreaktion ist die pathophysiologische Grundlage der meisten Asthma Patienten. Sie stellt die am weitesten verbreitete Entzündungsreaktion dar und ist mit dem oben beschriebenen immunologischen Mechanismus vom Typ 2 vergleichbar. Bei dieser Ausprägung ist eine starke T_h -Zell Polarisation hin zur T_h2 -Zelle nachweisbar. Dem gegenüber steht die als $T2^{\text{LOW}}$ bezeichnete Entzündungsreaktion, die in ihrer Ausprägung mit dem oben genannten immunologischen Mechanismus vom Typ 1 und 3 und somit den T_h -Zell-Populationen T_h1 und T_h17 einhergeht (Chung et al., 2014; R. Green et al., 2002; McGrath et al., 2012). Zusammenhängend betrachtet kommt den unterschiedlichen T_h -Zellpopulationen und insbesondere den T_h1 - und T_h2 -Zellen eine fundamentale Bedeutung bezüglich der Pathophysiologie der Erkrankung Asthma bronchiale zu.

1.2 T_h -Zellen

Physiologisch sind T_h2 -Zellen für Ihre Rolle bei der Abwehr von Parasiten bekannt und an der Entwicklung und Reifung von B-Zellen beteiligt (Sher et al., 1990). Sie sind jedoch auch maßgeblich an der Entstehung und Aufrechterhaltung von atopischen Erkrankungen, insbesondere Asthma bronchiale, beteiligt (Robinson et al., 1992).

Hauptaufgabe der T_h1 -Zellen ist die Aktivierung und Beihilfe zur Differenzierung von Zellen des Immunsystems, die durch Phagozytose, Lyse oder induzierte Apoptose an der Beseitigung von intrazellulären Pathogenen beteiligt sind (Spellberg et al., 2001).

T_h17 -Zellen wiederum beeinflussen durch ihre sezernierten Zytokine zum einen die Differenzierung und das Verhalten von neutrophilen Granulozyten und zum anderen die Produktion antimikrobieller Peptide durch Epithelzellen. Über die Wirkung auf neutrophile Granulozyten und Epithelien sind T_h17 -Zellen mit verantwortlich für den Schutz gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze (Annunziato et al., 2015; Ye et al., 2001).

Die unkontrollierte Dominanz einzelner Zellpopulationen ist in vielen Fällen die Ursache für die Ausprägung bestimmter Krankheitsbilder. Ein T_h1 -Lymphokinprofil findet sich bei organspezifischen Krankheitsbildern wie zum Beispiel Multipler Sklerose und Rheumatoider Arthritis, wohingegen ein T_h2 Lymphokinprofil bei Krankheiten des atopischen Formenkreises wie zum Beispiel Atopischer Dermatitis oder allergischem Asthma bronchiale messbar ist (Romagnani, 1994).

Die oben beschriebenen pathophysiologischen Grundlagen zeigen jedoch, dass bei der Erkrankung Asthma bronchiale in unterschiedlichen Ausprägungen sowohl T_h1/T_h17 -Zellen als auch T_h2 -Zellen eine Rolle spielen. Somit lassen sich unterschiedliche Krankheitsausprägungen von Asthma bronchiale durch die unterschiedliche Entwicklung der T_h -Zellpopulationen erklären. Ausgehend von der naiven T_h -Zelle führen unterschiedliche Einflüsse und spezielle Proteine zur Entwicklung und Reifung von T_h1 - oder T_h2 -Zellen.

1.2.1 Differenzierung von T_h1 -Zellen

Induziert wird die Entwicklung von der naiven T_h -Zelle zur T_h1 -Zelle durch den Kontakt des T-Zellrezeptor (TCR) mit dem auf Antigenpräsentierenden Zellen (APC) über Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) -Klasse-II-Rezeptoren präsentierten Antigen. Durch diesen Kontakt werden eine Reihe von Signalkaskaden ausgelöst. Effektorproteine sind unter anderem Tyrosinkinasen der tec protein tyrosine kinase (tec)-Familie (Rlk/Txk u. Itk) und Mitogen-aktivierende Proteinkinase (MAP-Kinasen) p38 (Szabo et al., 2003). Eine wichtige Rolle spielen kostimulierende Faktoren, ohne die eine vollständige Aktivierung und Reifung nicht möglich wäre (Chapoval et al., 2001; Özkaynak et al., 2001; Rottman et al., 2001). Ein durch IL-12, IL-18, IL-23, IL-27 und Interferon- γ geprägtes Zytokinmilieu ist ebenfalls entscheidend für die Differenzierung hin zu einer T_h1 -Zelle (Szabo et al., 2003). Produziert werden diese Faktoren von aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen (Abbas et al., 1996). Die Interaktion von IL-12 mit dem IL-12-Rezeptor führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 und 4 (Jacobson et al., 1995). Der im folgenden Reifungsprozess wichtigste Transkriptionsfaktor ist TBX21 (T-Bet) (Szabo et al., 2000). Der

Transkriptionsfaktor T-Bet sorgt durch die Aktivierung von Genen für die Produktion und Sezernierung des Hauptzytokins Interferon- γ sowie IL-2 und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) β (O'Garra et al., 2000; Szabo et al., 2000). Das T_h1 Hauptzytokin Interferon- γ ist bei Patienten mit hohem Asthmaschweregrad und signifikant bei nicht allergischen Patienten, also am ehesten bei Patienten mit einer $T2^{LOW}$ -Entzündungsreaktion, erhöht messbar (Raundhal et al., 2015; Truyen et al., 2006; Wisniewski et al., 2017). Im Rahmen eines T_h1/T_h2 -Ungleichgewichtes scheint die inhibierende Wirkung von Interferon- γ im Rahmen der Entwicklung von T_h2 -Zellen somit eine Auswirkung auf den Asthmaschweregrad zu haben (M.-L. Kuo et al., 2001).

1.2.2 Differenzierung von T_h2 -Zellen

Die Proliferation und Wirkung von T_h2 -Zellen ist typisch für die Krankheitsbilder des atopischen Formenkreises. Ausgelöst wird diese Differenzierung durch das Wechselspiel von mikrobiellen Milieu, Genetik und Umwelt, wobei abhängig von Art, Menge und Zeitpunkt der Interaktion mit dem Antigen Krankheit oder Toleranz entstehen können (Holgate et al., 2008). Die aktivierte T_h2 -Zelle ist, speziell im Rahmen der Allergieentwicklung, maßgeblich in die Pathogenese der chronisch allergischen Erkrankung Asthma bronchiale involviert.

Neben den oben genannten Faktoren scheinen auch epitheliale Zellen durch die Sezernierung von Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) und Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) und deren Wirkung auf dendritische Zellen und Mastzellen einen Einfluss auf die Entwicklung einer T_h2 -Antwort zu haben (Holgate, 2007; Medoff et al., 2008). Hauptmechanismus bei der Aktivierung von T_h -Zellen ist jedoch auch hier der direkte Kontakt zwischen TCR und Antigen, welches über MHC-Klasse-II-Rezeptoren auf APCs vermittelt wird. Eine Modulation dieser Interaktion wird durch kostimulierende Faktoren erreicht. Hier sind sowohl inhibierende als auch aktivierende Signalübertragungen möglich. Beispielsweise wirkt die Verbindung von APC-CD86 mit Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 (CTLA-4) inhibierend, die Interaktion von APC-ständigem CD80 in Kombination mit T-Lymphozyten-CD28 aktivierend (Lombardi et al., 2010). Kommt es zu einer Stimulation des TCR, wird der Transkriptionsfaktor Nuclear factor of activated T-cells 1 (NFAT1) aktiviert

und sorgt in Kombination mit IL-4 für eine Expression der nukleären Transkriptionsfaktoren GATA binding protein 3 (GATA-3) und STAT6.

Neben der oben beschriebenen T_H2-Aktivierung ist auch eine IL-4 unabhängige Aktivierung über Notch-Rezeptoren denkbar, die ebenfalls zu einer Aktivierung von GATA-3 führen könnte (Fang et al., 2007). Eine aktivierte und funktionsfähige T_H2-Zelle lässt sich über ihr produziertes und sezerniertes Zytokinspektrum charakterisieren. Hierzu zählen insbesondere IL-4, IL-5 (Mosmann et al., 1986) und IL-13 (Minty et al., 1993).

GATA-3 ist der kritische Regulator der T_H2-Entwicklung (Kurata et al., 1999; Scheinman et al., 2009; Swain et al., 1990; Zheng et al., 1997). Das im Zytosol aktivierte und durch MAP-Kinase p38 phosphorylierte GATA-3 aktiviert anschließend im Zellkern Gene auf dem Chromosom 5q31-33, die unter anderem für IL-4, IL-5, IL-13 und GM-CSF kodieren (Maneechotesuwan et al., 2007).

Neben der Aktivierung einzelner Gene inhibiert GATA-3 zusätzlich STAT4 und unterbindet somit die Aktivierung von T-Bet durch STAT4, was zur Aufrechterhaltung der T_H2-Polarisation führt. Umgekehrt kann T-Bet GATA-3 inhibieren (Grogan et al., 2002). Weitere Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel Activator protein 1 (AP-1), Nuclear factor for interleukin-6 (NF-IL-6) und c-Maf, sind ebenfalls an der Entwicklung der T_H2-Zelle beteiligt (Nakamura et al., 2005).

1.3 Transkriptionsfaktoren der T_H-Differenzierung

Für die Aufrechterhaltung der Differenzierung und Entwicklung hin zur T_H2-Zelle ist maßgeblich der Transkriptionsfaktor GATA-3 verantwortlich (O'Garra et al., 2016; C. Wang et al., 2015; Y. Wang et al., 2013). GATA-3 ist ein aus 443 Aminosäuren bestehendes Zink-Finger-Protein mit einem Molekulargewicht von errechneten 47,94 Kilodalton (kD) (NCBI, 2017a; Zhu et al., 2006). 6 GATA Transkriptionsfaktoren wurden beim Menschen bisher beschrieben. GATA-1 - 3 finden sich am ehesten in hämatopoetischen Zellen, GATA-4 - 6 eher in entodermalem Gewebe (Caramori et al., 2001). Untersuchungen bronchialer T_H-Zellen von Asthmatikern zeigten eine erhöhte GATA-3 Protein- und Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) -Expression (Caramori et al., 2001; Nakamura et al.,

1999). Sowohl im Maus-Model, als auch in der Untersuchung von humanen T_H -Zellpopulationen konnte der direkte Zusammenhang zwischen GATA-3 und der Entwicklung von T_H2 -Zellen nachgewiesen werden (Maneechotesuwan et al., 2007; Pai et al., 2004; Yamashita et al., 2004). Die Regulation von GATA-3 findet durch verschiedene Mechanismen und durch unterschiedliche Interaktionen statt. Maßgeblich ist hier der Haupttranskriptionsfaktor der T_H1 -Zell-Entwicklung, T-Bet, zu nennen. Ein hemmender Einfluss, auf die durch GATA-3 aufrechterhaltende Signalkaskade, durch T-Bet ist ebenso nachweisbar, wie umgekehrt der inhibierende Einfluss von GATA-3 auf die durch T-Bet vermittelten zellulären Entwicklungsschritte (Finotto et al., 2002; Hwang et al., 2005; Yoshimoto et al., 2007).

Das Protein T-Bet ist der entscheidende Transkriptionsfaktor für die Differenzierung und, wie oben schon durch den hemmenden Einfluss auf GATA-3 erklärt, die Aufrechterhaltung der Polarisierung hin zur T_H1 -Zelle (Hwang et al., 2005; Lazarevic et al., 2013; Sallusto, 2016; Szabo et al., 2000). T-Bet, auch T-box transcription factor TBX21 genannt, ist ein aus 535 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 58,34 kD (NCBI, 2017b). Die T-box transcription factor Familie besteht aus mehr als 20 Proteinen, die teilweise in verschiedenen Spezies hoch konserviert vorkommen (Wilson et al., 2002).

Mechanistisch binden sowohl T-Bet als auch GATA-3 an spezielle Bereiche der Desoxyribonukleinsäure (DNA) um so hemmende und auch aktivierende Einflüsse geltend zu machen (Lazarevic et al., 2013).

Zum einen sind somit die Transkriptionsfaktoren T-Bet und GATA-3 innerhalb einer Zelle ausschlaggebend für die Differenzierung und bleibende Polarisierung der T_H -Zellpopulation hin zur T_H1 - und T_H2 -Zelle, zum anderen sind die durch T_H1 - und T_H2 -Zellen ausgelösten immunologischen Mechanismen unter anderem Grundlage für die pathophysiologischen Mechanismen und die Einteilung der heterogenen Erkrankung Asthma bronchiale.

1.4 Hypothesen und Zielsetzung der Arbeit

Bei der Erkrankung Asthma bronchiale handelt es sich um eine stark heterogene Erkrankung, sowohl in ihrer klinischen Ausprägung, als auch bezogen auf die zugrundeliegenden pathophysiologischen und immunologischen Mechanismen. Therapiert wird Asthma bronchiale jedoch meist sehr einheitlich und symptomorientiert. Ein aktueller Forschungsschwerpunkt ist daher die Testung neuer, spezifischerer und möglichst kurativer Medikamente und damit verbunden auch die Etablierung einer möglichst einfachen und kostengünstigen Methode, das große Patientenkollektiv in möglichst eindeutige und therapeutisch relevante Untergruppen zu unterteilen.

Ziel dieser Arbeit war es, ein solches Testsystem zur Diagnostik bzw. Stratifizierung von Asthmapatienten durch Messung der Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-Bet in humanen Vollblutproben zu generieren.

Hierzu wurden drei **Hypothesen** formuliert: die Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-Bet können unter Verwendung eines Westernblot-Testsystems in humanem Vollblut nachgewiesen werden, es gibt qualitative Unterschiede zwischen den Messwerten für GATA3 und T-Bet im Vergleich von gesunden und kranken Probanden und die Messwerte für GATA-3 und T-Bet nehmen für Patientengruppen mit dem gleichen Endotyp vergleichbare Werte an. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die erste Hypothese überprüft.

Folgende **Fragestellungen** sollten hierzu untersucht werden:

Etablierung und Optimierung eines Testsystems unter Verwendung von rekombinantem Protein:

- Semi-quantitative Proteinkonzentrationsbestimmung und Beurteilung der Reinheit der rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet
- Nachweis der rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet mit polyklonalen Antikörpern
- Nachweis der rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet mit monoklonalen Antikörpern
- Optimierung der Sensitivität des Testsystems mit monoklonalen Antikörpern durch Variation des 2. Antikörpers und direkter Koppelung des 1. Antikörpers mit Meerrettichperoxidase (HRP)

- Überprüfung der Spezifität der monoklonalen Antikörper

Übertragung des optimierten Testsystems auf humane Vollblutproben:

- Nachweis von GATA-3 und T-Bet in humanem Vollblut mit polyklonalen Antikörpern
- Nachweis von GATA- 3 und T-Bet in humanem Vollblut mit monoklonalen Antikörpern
- Optimierung des Testsystems durch Variation des 2. Antikörpers und direkte Koppelung der monoklonalen Antikörper mit HRP

2 Material & Methoden

2.1 Material

Tab. 1 Westernblot Geräte

EasyPhor PAGE Mini-System	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D
Heraeus BIOFUGE pico	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, D
Kreis-Schüttler 3015	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D
Mikroliterspritze 1705 RN	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, CH
Minishaker MS2	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
peqPower E0203 250V	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
PerfectBlue Semi-Dry Elektrobloetter	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Rollenmischer RM5	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH&Co KG, Sondheim vor der Rhön, D
Röntgenkassette	Dr. Goos-Supreme GmbH, Heidelberg, D
Thermocell Cooling&Heating Block	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D

Tab. 2 Westernblot Marker

MagicMark™ XP, Western Protein Standard	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Precision Plus, Protein™ Dual Color Standards	BIO-RAD Laboratories Inc., Hercules, USA
Precision Plus, Protein™ WesternC™ Standards	BIO-RAD Laboratories Inc., Hercules, USA

Tab. 3 Westernblot Materialien

Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Bio-Safe™ Coomassie G250 Stain	BIO-RAD Laboratories Inc., Hercules, USA
Chromatography Paper 3MM CHR	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Gelatin from cold water fish skin	SIGMA-ALDRICH, Co., St. Louis, USA
Immobilon®-P Transfer Membrane	Merck KGaA, Gernsheim, D
Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

Tab. 4 IT

GIMP 2.8.10	GIMP Development Team
HP Scanjet 3800	Hewlett-Packard Developmentcompany, L.P., Houston, USA

Tab. 5 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Bromphenol Blue	SIGMA-ALDRICH, Co., St. Louis, USA
Developer G150	AGFA-Gevaert N.V., Mortsel, B
di-Natriumhydrogen-phosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ethanol (absolut)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ethanol 70% (V/V)	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (0,5 molar), pH 8.0	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, D
Glycerol	SIGMA-ALDRICH, Co., St. Louis, USA
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
H ₂ O-VE	Philipps-Universität Marburg, Marburg, D
IGEPAL® CA-630	SIGMA-ALDRICH, Co., St. Louis, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Avantor Performance Materials B.V., Deventer, NL
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Manuol Fixing Bath G354	AGFA-Gevaert N.V., Mortsel, B
Methanol ≥99,8%	SIGMA-ALDRICH, Co., St. Louis, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D

Material & Methoden

Natriumdesoxycholat (DOC)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Gernsheim, D
Natriumlaurylsulfat (SDS) ultra pure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Protease-Inhibitor	SIGMA-ALDRICH, Co., St. Louis, USA
Rotiphorese® Gel 30 (37, 5:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Salzsäure (HCl) rauchend 37%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Trizma® base	SIGMA-ALDRICH, Co., St. Louis, USA
Trizma® hydrochloride	SIGMA-ALDRICH, Co., St. Louis, USA
Tween® 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Wasser (H ₂ O GenPure Pro UV)	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, D

Tab. 6 Puffer

<p><u>10x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS):</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 80 Gramm (g) NaCl - 2 g KCl - 21,26 g Na₂PO₄ - 2H₂O - 2 g KH₂PO₄ - Mit 2 molarem NaOH auf pH 7,4 einstellen - Auf 1 Liter (l) mit H₂O-VE auffüllen
<p><u>1x Tween-Phosphatgepufferte Salzlösung (TPBS):</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 200 Milliliter (ml) 10x PBS - 1800 ml H₂O-VE - 10 ml Tween® 20
<p><u>4x Probenpuffer:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 20 ml 0,5 molares Trizma® hydrochloride (pH 6,8) - 4 g SDS ultra pure - 20 ml Glycerol - 200 Milligramm (mg) Bromphenol Blue - 2,5 ml 2-Mercaptoethanol - 7,5 ml H₂O-VE
<p><u>10x Laufpuffer:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 10 g SDS ultra pure - 30,3 g Trizma® base - 144,1 g Glycerol - 800 ml H₂O-VE
<p><u>10%-Ammoniumperoxodsulfat:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 1 g Ammoniumperoxodsulfat - 10 ml H₂O-VE
<p><u>Puffer B:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 1 g SDS ultra pure - 45,43 g Trizma® base - HCl (pH auf 8,8 einstellen) - Auf 250 ml mit H₂O-VE auffüllen
<p><u>Puffer C:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - 1,5 g SDS ultra pure - 9 g Trizma® base - HCl (pH auf 6,8 einstellen) - Auf 250 ml mit H₂O-VE auffüllen

Radioimmunpräzipitationstest-Puffer (RIPA-Puffer):

- 3 ml 5 molare NaCl-Lösung
- 1 ml 0,5 molares EDTA (pH 8.0)
- 5 ml 1 molares Tris (pH 8.0)
- 1 ml IGEPAL® CA-630
- 5 ml 10% DOC
- 1 ml 10% SDS ultra pure
- Auf 100 ml mit H₂O-VE auffüllen
- 2 Tabletten Protease-Inhibitor für 100 ml Puffer

Semidry-Puffer (Transferpuffer):

- 11,6 g Trizma® base
- 5,8 g Glycin
- 0,8 g SDS ultra pure
- 400 ml Ethanol (absolut)
- Auf 2 l mit H₂O-VE auffüllen

Tab. 7 Verbrauchsmaterialien

CELLSTAR® TUBES 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, OÖ
CELLSTAR® TUBES 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, OÖ
Eppendorf Reference® 0,5-10 Mikroliter (µl)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Eppendorf Reference® 10-100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, D
Eppendorf Reference® 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, D
epT.I.P.S. Standard/Bulk 0,1-20 µl	Eppendorf AG, Hamburg, D
epT.I.P.S. Standard/Bulk 2-200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, D
epT.I.P.S. Standard/Bulk 50-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, D
NOBAGLOVE®-Latex	NOBA Verbandmittel Danz GmbH u. Co. KG, Wetter (Ruhr), D
pipetus®-akku 100-240 Volt (V)	Hirschmann Laborgeräte GmbH&Co.KG; D
Reagiergefäße 2,0 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D
Reaktionsgefäße 3810X, 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
Serologische Pipette 5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D
Serologische Pipette 25 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, D

2.1.1 Antikörper

Bei den in Tabelle (Tab.) 8 aufgeführten Primärantikörpern und den in Tab. 9 aufgeführten Sekundärantikörpern und Molekülen handelt es sich um frei verfügbare Antikörper und Moleküle verschiedener Firmen.

Bei den in Tab. 10 und 11 aufgelisteten Antikörpern handelt es sich um die speziell für dieses Projekt von der DRG Instruments GmbH in Auftrag gegebenen und von der Firma BioGenes GmbH hergestellten monoklonalen Antikörper zur Detektion der humanen Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-Bet.

Die folgend aufgeführten Abkürzungen beziehen sich auf die Benennung der verwendeten Antikörper. Es handelt es sich um einen Auszug aus dem eigentlichen Abkürzungsverzeichnis (siehe Abschnitt 6).

Abkürzung	Deutsch / <i>Englisch</i>
α	anti
biot	biotinyliert / <i>biotinoylated</i>
D	Esel / <i>donkey</i>
G	Ziege / <i>goat</i>
GATA-3	<i>GATA binding protein 3</i>
H	Mensch / <i>human</i>
HIS	polyHistidin / <i>polyHistidine</i>
HRP	Meerrettichperoxidase / <i>Horseradish peroxidase</i>
κ	Immunglobulin leichte Kette κ
M	Maus / <i>mouse</i>
m	monoklonal / <i>monoclonal</i>
p	polyklonal / <i>polyclonal</i>
Pre	präabsorbiert / <i>preabsorbed</i>
R	Hase / <i>rabbit</i>
Str	Streptavidin
T-Bet	TBX21 oder T-box 21

Tab. 8 Primärantikörper

Bezeichnung	Firma
<p>Abkürzung: anti-(α)-GATA-3-pGαH-biot</p> <p>Englisch: polyclonal-Goat-IgG-anti-Human-GATA-3-biotinylated</p> <p>Deutsch: polyklonal-Ziege-IgG-anti-Mensch-GATA-3-biotinyliert</p> <p>Konzentration: 0,2 mg/ml.</p>	<p>R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA Catalog Number: BAF2605</p>
<p>Abkürzung: α-T-Bet-pRαH</p> <p>Englisch: polyclonal-Rabbit-IgG-anti-Human-T-Bet</p> <p>Deutsch: polyklonal-Hase-IgG-anti-Mensch-T-Bet</p> <p>Konzentration: 0,7 mg/ml</p>	<p>Abcam plc, Cambridge, UK Catalog Number: ab53174</p>
<p>Abkürzung: α-β-Aktin-mMaH</p> <p>Englisch: monoclonal-Mouse-IgG-anti-Human-β-Actin</p> <p>Deutsch: monoklonal-Maus-IgG-anti-Mensch-β-Aktin</p> <p>Konzentration: 1,7 mg/ml</p>	<p>SIGMA-ALDIRCH, Co., St. Louis, USA Catalog Number: A5441</p>
<p>Abkürzung: α-HIS-mM</p> <p>Englisch: monoclonal-Mouse-IgG-anti-polyHistidine</p> <p>Deutsch: monoklonal-Maus-IgG-anti-polyHistidin</p> <p>Konzentration: 2,5 mg/ml</p>	<p>SIGMA-ALDIRCH, Co., St. Louis, USA Catalog Number: H1029</p>

Tab. 9 Sekundärantikörper und Moleküle

Bezeichnung		Firma
Abkürzung:	Pre-pRaM-HRP	SIGMA-ALDRICH, Co., St. Louis, USA Catalog Number: SAB3701084
Englisch:	Preabsorbed-polyclonal-Rabbit-IgG-anti-Mouse-IgG-HRP	
Deutsch:	Präabsorbiert-polyklonal-Hase-IgG-anti-Maus-IgG-HRP	
Konzentration:	2 mg/ml	
Abkürzung:	Pre-pGaM-κ-HRP	Jackson Immuno Research Europe Ltd., Ely, UK Code Number: 115- 035-174
Englisch:	Preabsorbed-polyclonal-Goat-IgG-anti-Mouse-IgG-Immunglobuline-light-chain-κ-HRP	
Deutsch:	Präabsorbiert-polyklonal-Ziege-IgG-anti-Maus-IgG-Immunglobulin-leichte-Kette-κ-HRP	
Konzentration:	0,8 mg/ml	
Abkürzung:	Pre-pDaR-HRP	DIANOVA GmbH, Hamburg, D Bestellnummer: 711-035-152
Englisch:	Preabsorbed-polyclonal-Donkey-IgG-anti-Rabbit-IgG-HRP	
Deutsch:	Präabsorbiert-polyklonal-Esel-IgG-anti-Hase-IgG-HRP	
Konzentration:	0,8 mg/ml	
Abkürzung:	Str-HRP	Senova GmbH, Weimar, D
Name:	Streptavidin-PolyHRP 40	
Konzentration:	1 mg/ml	

Tab. 10 Primärantikörper BioGenes

Bezeichnung	Firma
<p>Abkürzung: α-T-Bet-mMaH 15-2-5</p> <p>Englisch: monoclonal-Mouse-IgG-anti-Human-T-Bet</p> <p>Deutsch: monoklonal-Maus-IgG-anti-Mensch-T-Bet</p> <p>Zell-Klon: 15-2-5</p> <p>Konzentration: 4,1 mg/ml</p>	BioGenes GmbH, Berlin, D
<p>Abkürzung: α-T-Bet-mMaH 16-1-5</p> <p>Englisch: monoclonal-Mouse-IgG-anti-Human-T-Bet</p> <p>Deutsch: monoklonal-Maus-IgG-anti-Mensch-T-Bet</p> <p>Zell-Klon: 16-1-5</p> <p>Konzentration: 3,9 mg/ml</p>	BioGenes GmbH, Berlin, D
<p>Abkürzung: α-T-Bet-mMaH 22-3-7</p> <p>Englisch: monoclonal-Mouse-IgG-anti-Human-T-Bet</p> <p>Deutsch: monoklonal-Maus-IgG-anti-Mensch-T-Bet</p> <p>Zell-Klon: 22-3-7</p> <p>Konzentration: 3,9 mg/ml</p>	BioGenes GmbH, Berlin, D
<p>Abkürzung: α-T-Bet-mMaH 30-1-5</p> <p>Englisch: monoclonal-Mouse-IgG-anti-Human-T-Bet</p> <p>Deutsch: monoklonal-Maus-IgG-anti-Mensch-T-Bet</p> <p>Zell-Klon: 30-1-5</p> <p>Konzentration: 1,4 mg/ml</p>	BioGenes GmbH, Berlin, D

Material & Methoden

Abkürzung:	α-GATA-3-mMαH 8-2-5	BioGenes GmbH, Berlin, D
Englisch:	monoclonal-Mouse-IgG-anti-Human-GATA-3	
Deutsch:	monoklonal-Maus-IgG-anti-Mensch-GATA-3	
Zell-Klon:	8-2-5	
Konzentration:	1,25 mg/ml	
Abkürzung:	α-GATA-3-mMαH 17-2-2	BioGenes GmbH, Berlin, D
Englisch:	monoclonal-Mouse-IgG-anti-Human-GATA-3	
Deutsch:	monoklonal-Maus-IgG-anti-Mensch-GATA-3	
Zell-Klon:	17-2-2	
Konzentration:	2 mg/ml	
Abkürzung:	α-GATA-3-mMαH 10-7-5	BioGenes GmbH, Berlin, D
Englisch:	monoclonal-Mouse-IgG-anti-Human-GATA-3	
Deutsch:	monoklonal-Maus-IgG-anti-Mensch-GATA-3	
Zell-Klon:	10-7-5	
Konzentration:	0,7 mg/ml	

Tab. 11 Primärantikörper BioGenes HRP-konjugiert

Bezeichnung		Firma
Abkürzung:	α-T-Bet-mMαH-HRP 22-3-7	BioGenes GmbH, Berlin, D
Englisch:	monoclonal-Mouse-IgG-anti-Human-T-Bet-HRP	
Deutsch:	monoklonal-Maus-IgG-anti-Mensch-T-Bet-HRP	
Zell-Klon:	22-3-7	
Konzentration:	15,5 Mikrogramm (μ g)/ml	
Abkürzung:	α-T-Bet-mMαH-HRP 30-1-5	BioGenes GmbH, Berlin, D
Englisch:	monoclonal-Mouse-IgG-anti-Human-T-Bet-HRP	
Deutsch:	monoklonal-Maus-IgG-anti-Mensch-T-Bet-HRP	
Zell-Klon:	30-1-5	
Konzentration:	71,7 μ g/ml	
Abkürzung:	α-GATA-3-mMαH-HRP 10-7-5	BioGenes GmbH, Berlin, D
Englisch:	monoclonal-Mouse-IgG-anti-Human-T-Bet-HRP	
Deutsch:	monoklonal-Maus-IgG-anti-Mensch-T-Bet-HRP	
Zell-Klon:	10-7-5	
Konzentration:	110,5 μ g/ml	

2.1.2 Proben

Die rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet wurden von den Firmen Trenzyme GmbH und Abnova Corporation bezogen (siehe Tab. 12).

Das Gesamtprotein aus den Zelltypen Jurkat und Humane Bronchialepithelzellen (HBE) sind innerhalb der Forschungsabteilung des Instituts für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Molekulare Diagnostik bereitgestellt worden (siehe Tab. 13). Bei Jurkat-Zellen handelt es sich um immortalisierte, humane T-Lymphozyten und bei HBE-Zellen um epitheliale Zellen aus dem Respirationstrakt im Bereich der Trachea.

Die humanen Vollblutproben gesunder Blutspender wurden von dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Molekulare Diagnostik der Universität Marburg für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Tab. 12 Rekombinante Proteine

Bezeichnung	Konzentration	Firma
GATA-3	1,4 µg/µl	Trenzyme GmbH, Konstanz, D
GATA-3	40 Nanogramm (ng)/µl	Abnova Corporation, Taipeh, RC
T-Bet	1,7 µg/µl	Trenzyme GmbH, Konstanz, D
T-Bet	20 ng/µl	Abnova Corporation, Taipeh, RC

Tab. 13 Gesamtprotein der Zelltypen

Gesamtprotein der Zelltypen	Konzentration
Jurkat	9,7 µg/µl
HBE	5,6 µg/µl

2.2 Methoden

2.2.1 Westernblot

Die mit 70% Ethanol gereinigten Glasplatten des EasyPhor PAGE Mini-Systems wurden zuerst mit 5,3 ml Trenngel (siehe Tab. 14) befüllt und anschließend mit Wasser (H₂O GenPure Pro UV) beschichtet. Nach dem Aushärten des Trenngels wurde das Wasser verworfen und die Kammer bis zum Rand mit Sammelgel (siehe Tab. 15) befüllt. Anschließend wurden die Kämme eingeführt. Nachdem die Gelstation in die Kammer überführt wurde, wurde diese innen und außen mit 1x Laufpuffer (siehe Tab. 6) befüllt. Die Kämme wurden entfernt.

Tab. 14 Trenngel

Reagenz	Menge (für 2 Gele)
10%-Ammoniumperoxodisulfat	80 µl
Wasser (H ₂ O GenPure Pro UV)	6,7 ml
Puffer B	4 ml
Rotiphorese 30	5,3 ml
TEMED	10 µl

Tab. 15 Sammelgel

Reagenz	Menge (für 2 Gele)
10%-Ammoniumperoxodisulfat	20 µl
Wasser (H ₂ O GenPure Pro UV)	2,8 ml
Puffer C	1,2 ml
Rotiphorese 30	720 µl
TEMED	8 µl

Die in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vorgelegten Proben wurden mit 2x Probenpuffer (siehe Tab. 6) auf 25 µl aufgefüllt. Humane Vollblutproben wurden 1:2 mit RIPA-Puffer (siehe Tab. 6) lysiert und anschließend auf 1:10 mit 1x PBS (siehe

Tab. 6) eingestellt, bevor diese mit 1x Probenpuffer auf 25 µl aufgefüllt wurden. Vor der Denaturierung wurden die Proben mit dem Minishaker MS2 vollständig durchmischt. Nach 10 Minuten denaturieren bei 95 Grad Celsius (°C) (Thermocell Cooling&Heating Block) und anschließender Zentrifugation für 10 Sekunden (sec) (Heraeus BIOFUGE pico), wurden die Proben und der Marker (siehe Tab. 2) mit einer Mikroliterspritze in die Geltaschen überführt. An das Gel wurde im Anschluss für ca. 2 Stunden eine Spannung von 80 Volt (V) angelegt.

Anschließend wurden die Gele aus der Apparatur gelöst und für 15 Minuten in Semidry-Puffer (siehe Tab. 6) gewaschen. Parallel wurde die Immobilon®-P Transfer-Membran für eine Minute in reinem Methanol aktiviert, mit Wasser (H₂O GenPure Pro UV) gewaschen und ebenfalls für 15 Minuten in Semidry-Puffer inkubiert. Um die Proteine vom Gel auf die Transfer-Membran zu übertragen wurden im Elektro-Blotter (PerfectBlue Semi-Dry Elektrobloetter) drei, in Semidry-Puffer getränkte Chromatography Paper, die wie oben beschrieben vorbereitete Transfer-Membran, das Gel und erneut drei in Semidry-Puffer getränkte Chromatography Paper geschichtet. Die Proteine wurden bei 12 V für 15 Minuten auf die Membran übertragen. Anschließendes Trocknen der Transfer-Membran fixierte die Proteine auf der Membran.

2.2.2 Coomassie-Brillant-Blau-Färbung

Die vorangehenden Arbeitsschritte bis zur Färbung des Gels mit Coomassie-Lösung sind mit denen aus Abschnitt 2.2.1, inklusive der Anlage einer Spannung von 80 V für ca. 2 Stunden, identisch.

Das Gel wurde nach der Entnahme aus der Gelstation dreimal für 5 - 10 Minuten mit Wasser (H₂O GenPure Pro UV) gewaschen, anschließend mit Coomassie-Lösung vollständig bedeckt und für mindestens 1 - 2 Stunden dort belassen. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser (H₂O GenPure Pro UV) konnte die Färbung beurteilt werden.

2.2.3 Antikörperfärbung und Detektion

Anschließend an den Abschnitt 2.2.1 wurde die Transfer-Membran für die Antikörperfärbung und Detektion weiter vorbereitet.

Die getrocknete Transfer-Membran wurde mit reinem Methanol reaktiviert und kurz mit Wasser (H₂O GenPure Pro UV) gewaschen. Pro Membran wurden 25 ml einer 5%igen Fischgelatine-1x TPBS Lösung (siehe Tab. 6) hergestellt und die Membran mit dieser Lösung auf einem Kreis-Schüttler für 30 Minuten geblockt. Anschließend wurde dreimal für 15 Minuten mit 1x TPBS auf dem Kreis-Schüttler gewaschen. Danach wurde die Membran in einem 50 ml CELLSTAR® TUBE über Nacht bei 4 °C auf dem Rollenmischer mit dem 1. Antikörper inkubiert (siehe Tab. 8, Tab. 10 und Tab. 11). Am darauffolgenden Tag wurde die Transfer-Membran erneut dreimal für 15 Minuten mit 1x TPBS auf dem Kreis-Schüttler gewaschen, für 2 Stunden in einem 50 ml CELLSTAR® TUBE auf dem Rollenmischer mit dem 2. Antikörper (siehe Tab. 9) inkubiert und anschließend zweimal 15 Minuten mit 1x TPBS und einmal für 15 Minuten mit 1x PBS gewaschen.

Sollte die gleiche Transfer-Membran später ein zweites Mal mit einem Antikörper inkubiert werden, so wurde die Membran wie folgt vorbereitet. Die getrocknete Membran wurde mit reinem Methanol für eine Minute reaktiviert und danach kurz mit Wasser (H₂O GenPure Pro UV) gewaschen. Anschließend wurde, abhängig von der Stärke des ursprünglichen Signals, 5 - 15 Minuten mit 0,2 molaren NaOH inkubiert und anschließend mit Wasser (H₂O GenPure Pro UV) und danach für 10 Minuten mit 1x TPBS gewaschen. Nach erneutem Blocken mit 5%iger Fischgelatine-1x TPBS Lösung wurde dreimal 15 Minuten mit 1x TPBS gewaschen und wieder mit den gewünschten Antikörpern nach obigen Schema inkubiert.

Für die Detektion wurde pro Transfer-Membran jeweils 2 ml Färbelösung (Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate) gleichmäßig auf die Membran pipettiert. Nach 5 Minuten unter Ausschluss von Lichtexposition wurde die überschüssige Flüssigkeit mit Papiertüchern entfernt und die Transfer-Membran in die Röntgenkassette überführt. Je nach Bedarf wurde in der Dunkelkammer der Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm™ ECL) zwischen 15 Sekunden bis

30 Minuten belichtet und anschließend von Hand entwickelt (Developer G150), fixiert (Manuol Fixing Bath G354) und gewaschen.

Zur weiteren Dokumentation und Archivierung wurden die belichteten und entwickelten Röntgenfilme mit einem Scanner digitalisiert und anschließend mit einem Bildbearbeitungsprogramm bearbeitet (siehe Tab. 4).

3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines Westernblot-Systems für den Nachweis von GATA-3 und T-Bet, im Rahmen des Förderprogramms „Zentrales Innovationsprogramm Mittelstand“ des Bundesministeriums für Wirtschaft und Technologie (BMWi), als Kooperationsprojekt zwischen dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie - Molekulare Diagnostik der Philipps-Universität Marburg und der DRG Instruments GmbH. Hierzu wurde die Methode zunächst für den Nachweis der rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet optimiert und anschließend auf humanes Vollblut übertragen. Parallel zu dieser Arbeit entwickelte die DRG Instruments GmbH einen Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Messung von humanem GATA-3 und humanem T-Bet. Die sowohl in dieser Arbeit als auch von der DRG Instruments GmbH verwendeten rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet wurden im Auftrag der DRG Instruments GmbH von der Firma Trenzyme GmbH hergestellt. Mit Hilfe dieser rekombinanten Proteine stellte die Firma BioGenes GmbH im Auftrag der DRG Instruments GmbH speziell für dieses Projekt monoklonale Maus-Antikörper gegen GATA-3 und T-Bet her. Sowohl die rekombinanten Proteine als auch die monoklonalen Maus-Antikörper wurden im Rahmen dieser Arbeit auf Ihre Qualität und Spezifität hin untersucht.

Zu Beginn dieser Arbeit war durch Vorarbeit innerhalb der Arbeitsgruppe bereits ein auf polyklonalen Antikörpern basierendes Westernblot-Nachweissystem für GATA-3 und T-Bet in Gesamtprotein aus Zelltypen, Vollblut und für beide rekombinanten Proteine etabliert worden.

3.1 Nachweis der rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet

3.1.1 Coomassie-Brillant-Blau-Färbung

Zunächst wurden die rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet in unterschiedlicher Menge parallel auf ein Gel aufgetragen und im Anschluss mit einer Coomassie-Brillant-Blau-Lösung eingefärbt, um semi-quantitativ die Proteinkonzentration sichtbar zu machen und zusätzlich die Reinheit der Probe beurteilen zu können. Aufgetragen wurde rekombinantes Protein aus jeweils zwei unterschiedlichen Herstellungsansätzen, um eventuelle Qualitätsunterschiede für die weitere Verwendung ausschließen zu können.

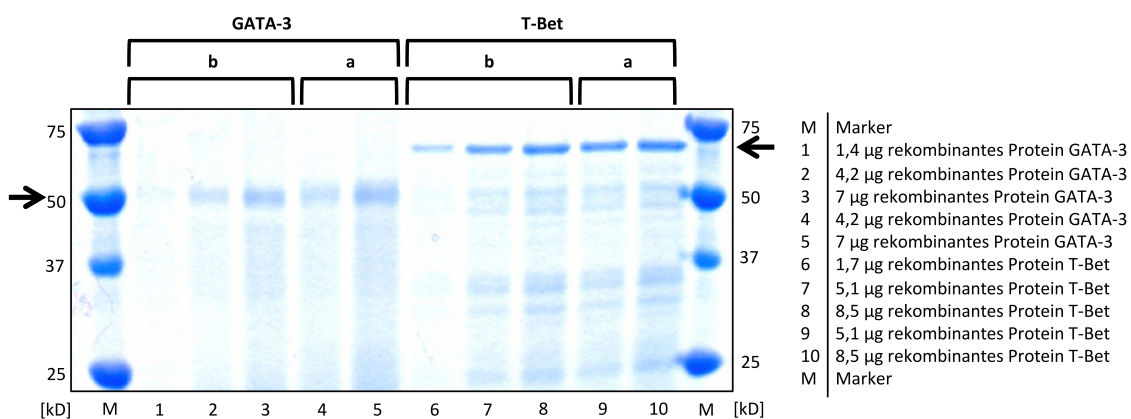


Abb. 1 Coomassie-Brillant-Blau-Färbung

Es wurde rekombinantes Protein GATA-3 (1 - 5) des 2. Ansatzes (b) und des 1. Ansatzes (a) sowie rekombinantes Protein T-Bet (6 - 10) des 2. Ansatzes (b) und des 1. Ansatzes (a) aufgetragen. Das mit Coomassie-Lösung behandelte 10%ige Polyacrylamid-Gel zeigt bei ca. 50 kD Banden für GATA-3 (→) und bei ca. 70 kD Banden für T-Bet (←).

In Abbildung (Abb.) 1 ist die Coomassie-Brillant-Blau-Färbung des Gels zu sehen. Für GATA-3 wurden auf der linken Seite zwei unterschiedliche Konzentrationen des ersten Produktionsansatzes und drei unterschiedliche Konzentrationen des zweiten Produktionsansatzes aufgetragen. Auf der rechten Seite wurde nach dem gleichen Schema das rekombinante Protein T-Bet aufgetragen. Mit Pfeilen ist die Höhe, auf der jeweils GATA-3 und T-Bet zu detektieren sind, markiert. Das rekombinante Protein GATA-3 ist bei ca. 50 kD zu detektieren, das rekombinante Protein T-Bet bei ca. 70 kD. Das molekulare Gewicht der Bande entspricht jeweils den Angaben des Herstellers. Unterhalb

von GATA-3 und T-Bet sind weitere Proteinfragmente angefärbt worden. Dieses individuelle Muster war auch in den folgenden Versuchen reproduzierbar und wird aus diesem Grund dort nicht weiter beschrieben. Am ehesten handelt sich hierbei um Degradierungsprodukte und/oder Verunreinigungen mit bakteriellem Protein aus dem Expressionssystem bei der Herstellung durch die Firma Trenzyme GmbH. Vergleicht man die Ergebnisse der unterschiedlichen Produktionsansätze für GATA-3 und T-Bet, so ist kein Qualitätsunterschied zu erkennen. Ab einer Menge von 4,2 µg Protein für GATA-3 und 1,7 µg für T-Bet ist eine prominente Bande zu sehen. Mit steigender Konzentration des rekombinanten Proteins nimmt auch die Intensität der Banden entsprechend zu.

3.1.2 Nachweis der rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet mit polyklonalen Antikörpern

Neben der Coomassie-Brillant-Blau-Färbung wurden die rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet mit dem schon etablierten polyklonalen Antikörper-System im Westernblot nachgewiesen. Zum Nachweis von GATA-3 wurde der Antikörper polyklonal-Ziege-IgG-anti-Mensch-GATA-3-biotinyliert (anti-(α)-GATA-3-pGaH-biot) in Kombination mit dem Protein Streptavidin-PolyHRP 40 (Str-HRP) verwendet. Bei Str-HRP handelt es sich um das Protein Streptavidin, welches mit HRP als Signalgeber für die Detektion konjugiert wurde. Da Streptavidin in der Lage ist Biotin zu binden, kann so der biotinylierte 1. Antikörper detektiert werden. Für den Nachweis von T-Bet wurde der Antikörper polyklonal-Hase-IgG-anti-Mensch-T-Bet (α -T-Bet-pR α H) in Kombination mit dem Antikörper Präabsorbiert-polyklonal-Esel-IgG-anti-Hase-IgG-HRP (Pre-pD α R-HRP) verwendet.

Zunächst wurde die Spezifität der Antikörper-Pärchen unter Verwendung von rekombinantem Protein gezeigt.

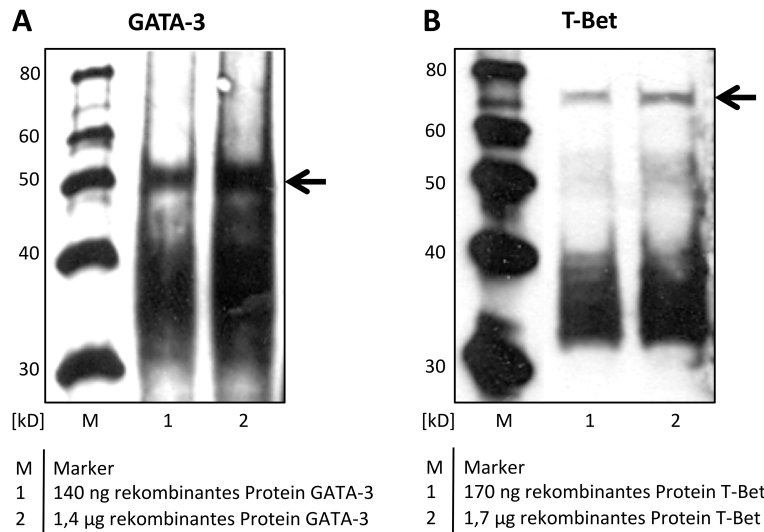


Abb. 2 Nachweis der rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet mit polyklonalen Antikörpern

(A) Rekombinantes Protein GATA-3 wurden bei ca. 50 kD (↔) mit α -GATA-3-pGαH-biot 1:1000 in Verbindung mit Str-HRP 1:5000 nachgewiesen. (B) Rekombinantes Protein T-Bet wurden bei ca. 70 kD (↔) mit α -T-Bet-pRaH 1:750 in Verbindung mit Pre-pDaR-HRP 1:15.000 nachgewiesen. 10%iges Polyacrylamid-Gel

In Abb. 2 ist die Struktur der Banden mit denen der Coomassie-Brillant-Blau-Färbung in Abb. 1 vergleichbar. Abb. 2A zeigt das rekombinante Protein GATA-3 in zwei unterschiedlichen Konzentrationen, die Abb. 2B zeigt nach dem gleichen Schema das rekombinante Protein T-Bet. Für GATA-3 ist bei ca. 50 kD eine Bande zu sehen, für T-Bet bei ca. 70 kD. Zusätzlich nachgewiesenes Protein unterhalb der oben genannten Bande ähnelt dem Protein-Muster der Coomassie-Brillant-Blau-Färbung aus Abb. 1. Da diese Protein-Strukturen nicht nur in der Coomassie-Brillant-Blau-Färbung, sondern auch unter Verwendung der Antikörper sichtbar sind, ist anzunehmen, dass es sich hierbei um Fragmente und/oder Degradierungsprodukte der rekombinanten Proteine handelt.

Geringere Mengen Protein lassen sich im Westernblot als schwächere Bande wiederfinden. Abhängig von der Menge an aufgetragenem Protein ist somit auch die Intensität der Banden unterschiedlich. Die Bande bei 70 kD für T-Bet und die Bande bei 50 kD für GATA-3 konnten bestätigt werden.

Zur Überprüfung der Spezifität des 2. Antikörpers wurde eine Negativkontrolle angefertigt. Mit dem Begriff „Negativ-Kontrolle“ ist in dieser Arbeit gemeint, dass

bei exakt der gleichen Versuchsdurchführung ohne den 1. Antikörper gearbeitet wird, um eine unspezifische Detektion durch den 2. Antikörper ausschließen zu können.

Die Negativ-Kontrollen für Str-HRP und Pre-pDaR-HRP sind negativ (Ergebnis nicht gezeigt). Es konnte nachgewiesen werden, dass die 2. Antikörper nicht unspezifisch mit Protein reagieren und ein Nachweis der spezifischen Proteine nur in Gegenwart der 1. Antikörper erfolgt.

3.1.3 Nachweis der rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet mit monoklonalen Maus-Antikörpern

Alternativ zu den getesteten polyklonalen Antikörpern wurden monoklonale Antikörper der Firma BioGenes GmbH für die Detektion von GATA-3 und T-Bet im Westernblot getestet.

Die zur Generierung der monoklonalen Antikörper verwendeten Tiere wurden mit den rekombinanten Proteinen GATA-3 und T-Bet der Firma Trenzyme GmbH immunisiert. Von der Firma BioGenes GmbH wurden anschließend 4 monoklonale Maus-Antikörper zur Detektion des humanen Transkriptionsfaktors GATA-3 und 6 monoklonale Maus-Antikörper zur Detektion des humanen Transkriptionsfaktors T-Bet an die DRG Instruments GmbH geliefert. Diese 10 monoklonalen Antikörper wurden von der DRG Instruments GmbH auf deren optimale Verwendbarkeit im Rahmen des ELISA-Testsystems hin untersucht. So wurden 3 monoklonale Antikörper zur Detektion von GATA-3 und 4 monoklonale Antikörper zur Detektion von T-Bet zur weiteren Verwendung ausgewählt. Diese Antikörper wurden von der DRG Instruments GmbH zur Entwicklung des ELISA-Testsystems und im Rahmen dieser Arbeit zur Etablierung des Westernblot-Nachweisverfahrens eingesetzt.

Verwendet wurden hier für die Detektion von GATA-3 und T-Bet die Antikörper monoklonal-Maus-IgG-anti-Mensch-GATA-3 (α -GATA-3-mMaH) 17-2-2 und monoklonal-Maus-IgG-anti-Mensch-T-Bet (α -T-Bet-mMaH) 16-1-5 jeweils in Verbindung mit Präabsorbiert-polyklonal-Hase-IgG-anti-Maus-IgG-HRP (Pre-pRaM-HRP).

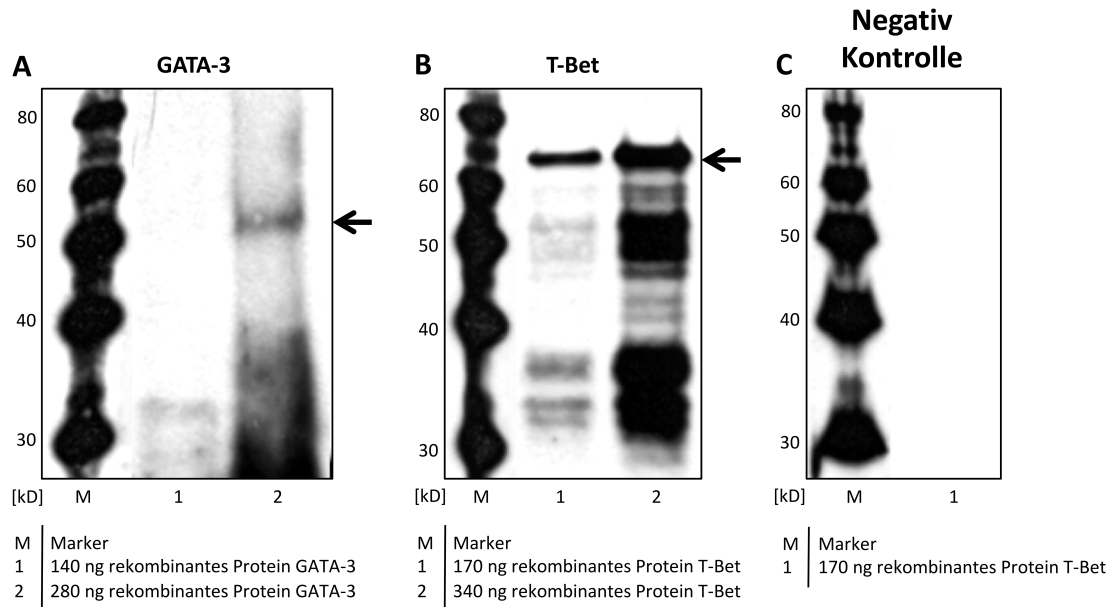


Abb. 3 Nachweis der rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet mit monoklonalen Antikörpern und Pre-pRaM-HRP

(A) 280 ng (2), jedoch nicht 140 ng (1) rekombinantes Protein GATA-3 konnten bei ca. 50 kD (←) mit α -GATA-3-mMaH 17-2-2 1:2000 in Verbindung mit Pre-pRaM-HRP 1:7500 nachgewiesen werden. (B) Rekombinantes Protein T-Bet wurde bei ca. 70 kD (←) mit α -T-Bet-mMaH 16-1-5 1:4000 in Verbindung mit Pre-pRaM-HRP 1:7500 nachgewiesen. (C) Die Negativ-Kontrolle von Pre-pRaM-HRP 1:7500 zeigt keine Banden. 10%iges Polyacrylamid-Gel

In Abb. 3A ist das Ergebnis für das rekombinante Protein GATA-3 und in Abb. 3B für T-Bet zu sehen. Abb. 3C zeigt die Negativ-Kontrolle von Pre-pRaM-HRP. Die Position der detektierten Banden entspricht denen aus 3.1.1 und 3.1.2 mit einer bei ca. 50 kD gelegenen Bande für das rekombinante Protein GATA-3 und einer bei ca. 70 kD sichtbaren Bande für das rekombinante Protein T-Bet.

Der Nachweis von rekombinantem Protein GATA-3 (Abb. 3A) gelang nur für 280 ng, nicht jedoch für 140 ng Gesamtprotein. Die Bande bei ca. 50 kD repräsentiert GATA-3. Für die hier verwendete Antikörperpaarung liegt die Nachweisgrenze von rekombinantem Protein GATA-3 zwischen 140 ng und 280 ng rekombinantem Protein. Im weiteren Verlauf wurde diesbezüglich mit größeren Probenmengen bei der Verwendung von monoklonalen Antikörpern gearbeitet. T-Bet (Abb. 3B) war bei ca. 70 kD konzentrationsabhängig nachweisbar.

Die Negativ-Kontrolle (Abb. 3C) von Pre-pRaM-HRP war bei einer Belichtungszeit von bis zu 30 Minuten negativ. Es zeigte sich keine unspezifische Reaktion des 2. Antikörpers mit Protein aus der Probe und eine spezifische Reaktion in Kombination mit den monoklonalen Maus-Antikörpern.

3.1.4 Nachweis der rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet mit monoklonalen Maus Antikörpern unter Variation des 2. Antikörpers

Im Unterschied zu dem in 3.1.3 beschriebenen Versuch wurde im weiteren Vorgehen der 2. Antikörper durch Präabsorbiert-polyklonal-Ziege-IgG-anti-Maus-IgG-Immunglobulin-leichte-Kette- κ -HRP (Pre-pGaM- κ -HRP) ersetzt. Grund für die Verwendung eines alternativen 2. Antikörpers, der spezifisch gegen die leichte Kette von Maus-Immunglobulinen gerichtet ist, war die Präsenz eines unspezifischen Signals in der Negativ-Kontrolle von Pre-pRaM-HRP während der Arbeit mit humanen Vollblutproben (siehe Abschnitt 3.3.4). Da unter Verwendung eines denaturierenden Gels die schwere Kette der Immunglobuline, mit einem Gewicht von ca. 50 kD, auf gleicher Höhe läuft wie die zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-Bet, sollte so eine mögliche Signalgenerierung durch den 2. Antikörper vermindert, bzw. vermieden werden.

In aufsteigenden Konzentrationsschritten sind in Abb. 4A bei ca. 50 kD die an Intensität zunehmenden Banden für GATA-3 zu sehen. In Abb. 4B wurden unterschiedliche Konzentrationen von rekombinantem Protein T-Bet aufgetragen. Die Bande für T-Bet ist hier bei ca. 70 kD zu finden und zeigt die aufsteigende Konzentration der Probe durch Zunahme der Intensität an.

Die Negativ-Kontrolle von Pre-pGaM- κ -HRP zeigt keine Banden und somit keine unspezifische Signalamplifikation (Ergebnis nicht gezeigt), bei gleichzeitig spezifischer Signalgebung unter Verwendung der monoklonalen Maus-Antikörper.

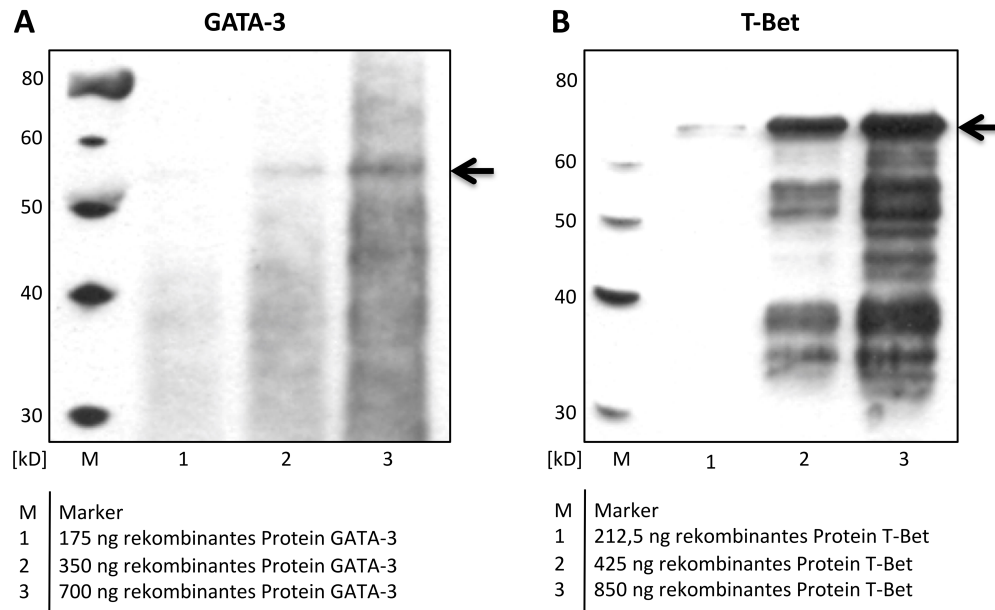


Abb. 4 Nachweis der rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet mit monoklonalen Antikörpern und Pre-pGαM-κ-HRP

(A) Rekombinantes Protein GATA-3 ist bei ca. 50 kD (↔) mit α-GATA-3-mMaH 17-2-2 1:2000 in Verbindung mit Pre-pGαM-κ-HRP 1:5000 nachweisbar. (B) Rekombinantes Protein T-Bet ist bei ca. 70 kD (↔) mit α-T-Bet-mMaH 30-1-5 1:2000 in Verbindung mit Pre-pGαM-κ-HRP 1:5000 nachweisbar. 10%iges Polyacrylamid-Gel

3.1.5 Nachweis der rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet mit HRP konjugierten monoklonalen Maus-Antikörpern

Um das System zu vereinfachen und die Anzahl der möglichen Fehlerquellen durch eine unspezifische Signaldarstellung durch den 2. Antikörper zu minimieren, wurden einige monoklonale Maus-Antikörper von der DRG Instruments GmbH direkt mit HRP konjugiert, um auf einen 2. Antikörper verzichten zu können.

Verwendet wurden hier die Antikörper monoklonal-Maus-IgG-anti-Mensch-T-Bet-HRP (α -GATA-3-mMaH-HRP) 10-7-5 und monoklonal-Maus-IgG-anti-Mensch-T-Bet-HRP (α -T-Bet-mMaH-HRP) 22-3-7.

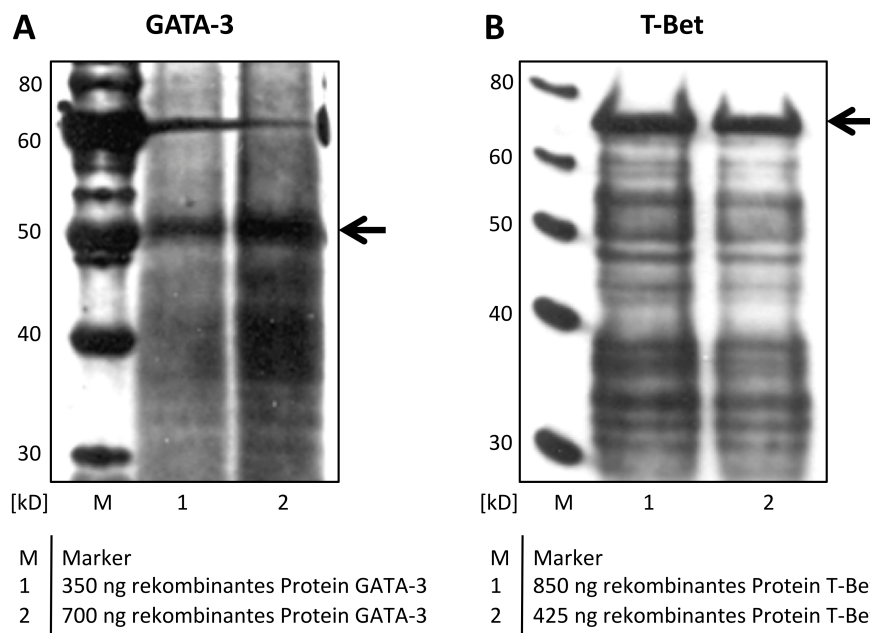


Abb. 5 Nachweis der rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet mit HRP konjugierten monoklonalen Antikörpern

(A) Rekombinantes Protein GATA-3 ist bei ca. 50 kD (↔) mit α -GATA-3-mMaH-HRP 10-7-5 1 μ g/ml nachweisbar. (B) Rekombinantes Protein T-Bet lässt sich bei ca. 70 kD (↔) mit α -T-Bet-mMaH-HRP 22-3-7 1 μ g/ml nachweisen. 10%iges Polyacrylamid-Gel

In Abb. 5A wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen des rekombinanten Proteins GATA-3 aufgetragen und in Abb. 5B ebenfalls in aufsteigender Konzentration das rekombinante Protein T-Bet. In Abb. 5A ist auf Höhe von ca. 50 kD die Bande für GATA-3 zu sehen und in Abb. 5B bei ca. 70 kD die Bande

für T-Bet. Es wird eine ausreichend gute Signalstärke durch die HRP konjugierten Antikörper auch ohne Verwendung eines 2. Antikörpers erreicht.

Das Protein-Muster unterhalb der Banden bei ca. 50 und 70 kD ist auch in diesem Versuch sichtbar. Die negativen Negativ-Kontrollen aus den vorherigen Versuchen in Kombination mit dem sichtbaren Protein-Muster in diesem Versuch spricht für eine Bindung der monoklonalen Maus-Antikörper an Proteine und/oder Proteinfragmente in den hier verwendeten Proben der rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet.

3.2 Sensitivitäts- und Spezifitätsprüfung der monoklonalen Maus-Antikörper

Die monoklonalen Maus-Antikörper der Firma BioGenes GmbH wurden mit Hilfe der folgenden Versuche, unter Verwendung der rekombinanten Proteine der Firma Trenzyme GmbH und auch unter Verwendung von rekombinantem Protein GATA-3 und T-Bet der Firma Abnova Corporation, auf ihre Kreuzreaktivität und Targetspezifität hin untersucht.

3.2.1 Nachweis der rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet unterschiedlicher Hersteller mit monoklonalen Maus-Antikörpern

Um zu überprüfen, dass die BioGenes Antikörper nicht nur das rekombinante Protein, gegen welches Sie hergestellt wurden (Trenzyme GmbH), erkennen, wurde zum Vergleich rekombinantes Protein der Firma Abnova Corporation auf ein Gel aufgetragen und im Westernblot detektiert.

In Abb. 6A - D ist jeweils rekombinantes Protein der Firma Abnova Corporation und Trenzyme GmbH aufgetragen worden. Die Abb. 6A und B zeigt den Nachweis von rekombinantem Protein GATA-3, die Abb. 6C und D den Nachweis von rekombinantem Protein T-Bet. Es wurde für beide Proteine mit HRP und nicht HRP konjugierten Antikörpern gearbeitet.

Für keinen monoklonalen Maus-Antikörper konnte eine Bindung an rekombinantes Protein GATA-3 der Firma Abnova Corporation gezeigt werden.

Für das rekombinante Protein GATA-3 der Firma Trenzyme ist eine Bande bei ca. 50 kD zu sehen. Sowohl in Abb. 6C als auch in Abb. 6D ist für die rekombinanten Proteine der Firmen Abnova Corporation und Trenzyme ein Signal zu sehen. Für das rekombinante Protein T-Bet der Firma Trenzyme GmbH bei ca. 70 kD. Für das rekombinante Protein T-Bet der Firma Abnova Corporation ist bei ca. 80 kD, entsprechend der Angaben des Herstellers, eine Bande sichtbar. Die zusätzliche Bande bei ca. 100 kD oberhalb des rekombinanten Proteins T-Bet der Firma Abnova Corporation wird von Seiten des Herstellers nicht weiter erläutert. Da sich diese Bande bei ca. 100 kD unter Verwendung der monoklonalen Maus-Antikörper zeigt, sind hier homologe Sequenzabschnitte verglichen mit dem rekombinanten Protein T-Bet und/oder dimerisierte Proteine eine mögliche Erklärung für die Signalgebung.

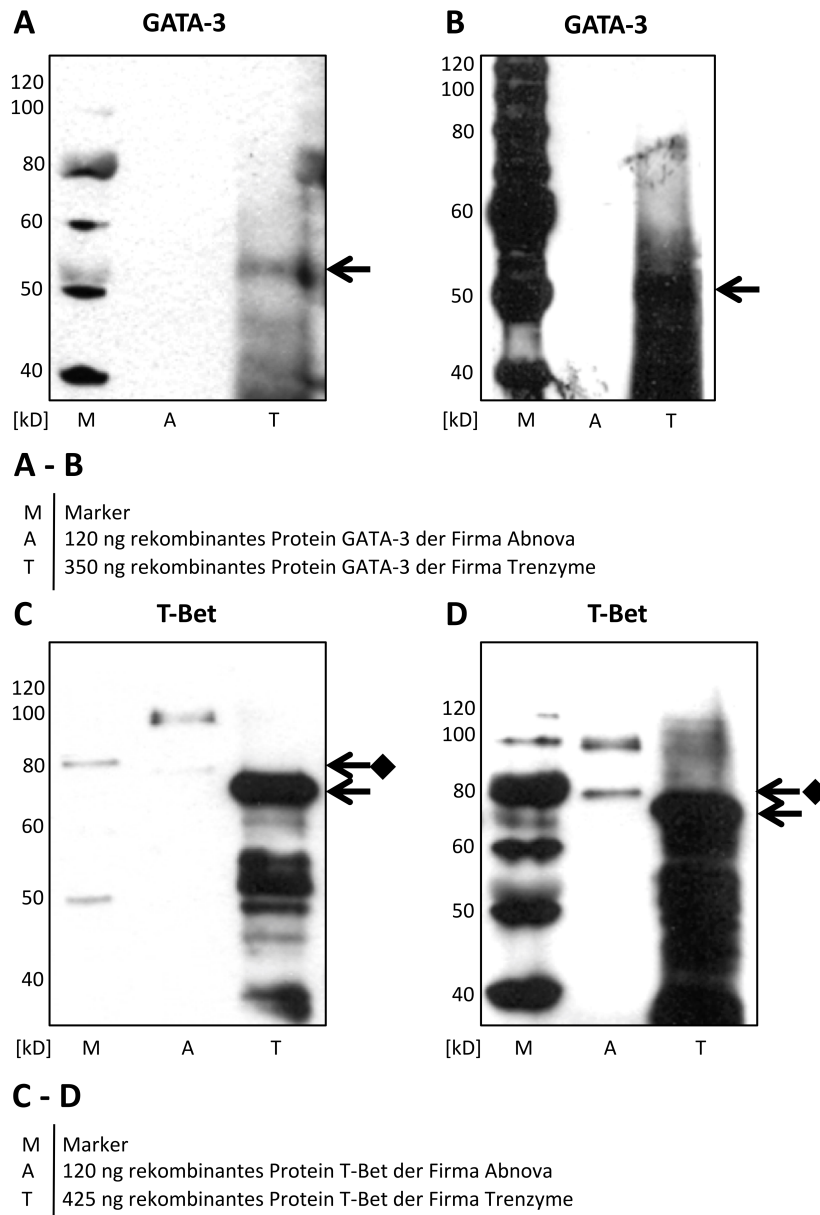


Abb. 6 Spezifitätsüberprüfung der monoklonalen Maus-Antikörper durch Test von rekombinantem Protein unterschiedlicher Hersteller

(A - B) Weder mit α -GATA-3-mMaH 10-7-5 1:2000 in Verbindung mit Pre-pGaM- κ -HRP 1:5000 (A), noch mit α -GATA-3-mMaH-HRP 10-7-5 1:110 (B), konnte rekombinantes Protein GATA-3 der Firma Abnova Corporation nachgewiesen werden. Für rekombinantes Protein GATA-3 der Firma Trenzime ist bei ca. 50 kD (\blackleftarrow) eine Bande nachweisbar. (C - D) Sowohl mit α -T-Bet-mMaH 30-1-5 1:2000 in Verbindung mit Pre-pGaM- κ -HRP 1:5000 (C), als auch mit α -T-Bet-mMaH-HRP 30-1-5 1:70 (D), konnte rekombinantes Protein T-Bet der Firma Abnova Corporation bei ca. 80 kD ($\blackleftarrow\blacklozenge$) und rekombinantes Protein T-Bet der Firma Trenzime bei ca. 70 kD (\blackleftarrow) nachgewiesen werden. 10%iges Polyacrylamid-Gel

3.2.2 Kreuzreaktivitätsexperiment der monoklonalen Maus-Antikörper

Um heraus zu finden, wie spezifisch die Antikörper der Firma BioGenes GmbH ihr Antigen binden, wurden die Antikörper im Kreuztest gegen das jeweils andere rekombinante Protein getestet. α -T-Bet-Antikörper gegen rekombinantes Protein GATA-3 und umgekehrt. Als 2. Antikörper wurde bei den nicht HRP konjugierten Antikörpern Pre-pGaM- κ -HRP verwendet.

In Abb. 7A und B wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper zur Detektion von GATA-3 mit einer Verdünnung von 1:2000 und 1:4000 gegen das rekombinante Protein T-Bet getestet. Wie in Abb. 6A zu sehen ist, zeigen sich Banden bei ca. 70 kD in Ihrer Intensität der eingesetzten Menge an rekombinantem Protein T-Bet entsprechend. Zusätzliche Banden, wie in den vorherigen Versuchen, unterhalb der Bande von 70 kD sind nicht zu sehen. Eine Bande ist in Abb. 6B nicht zu sehen. Daraus lässt sich schließen, dass durch eine höhere Verdünnung die unspezifische Bindung des α -GATA-3 Antikörpers an das rekombinante Protein T-Bet stark reduziert werden kann. Auch für den HRP konjugierten Antikörper in Abb. 7C sind Banden bei 70 kD zu sehen. Zieht man die unauffällige Negativ-Kontrolle aus 3.1.4 (Ergebnis nicht gezeigt) hinzu, so scheint der verwendete 1. Antikörper für die Generierung des Signals verantwortlich zu sein. Zusätzliche Banden unterhalb 70 kD sind nur sehr schwach auszumachen.

Vergleichbare Untersuchungen unter Anwendung von monoklonalen Maus-Antikörpern zur Detektion von T-Bet, HRP und nicht HRP konjugiert, in Kombination mit rekombinanten Protein GATA-3 zeigten in keinem der Ansätze Banden auf Höhe von 50 kD (Ergebnis nicht gezeigt).

Neben der Kreuzreaktivität der Antikörper gegenüber dem rekombinanten Protein, wäre auch eine Bindung an die in der Produktion verwendete PolyHistidin-Markierung (HIS-Tag) denkbar. Das Einfügen der Aminosäuresequenz des HIS-Tags in das Leseraster des zu klonierenden Gens führt zur Produktion des entsprechenden Proteins, in diesem Fall GATA-3 und T-Bet, mit zusätzlicher PolyHistidin-Markierung. Diese kann anschließend, aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften, zur Aufreinigung des entsprechenden Proteins genutzt werden.

Um zu überprüfen auf welcher Höhe das meiste Histidin detektiert werden kann, wurden die rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet jeweils mit

monoklonal-Maus-IgG-anti-polyHistidin (α -HIS-mM) inkubiert. In Abb. 7D ist das Ergebnis für das rekombinante Protein T-Bet zu sehen. Es zeigen sich Banden bei ca. 70 kD, die in Ihrer Intensität und Aufteilung mit denen der Kreuzreaktivität der α -GATA-3-Antikörper vergleichbar sind. Ebenfalls nur sehr schwach sind hier weitere Banden unterhalb von ca. 70 kD zu sehen. Hierbei scheint es sich auch um Proteinstrukturen mit anhängendem HIS-Tag zu handeln, da diese mit α -HIS-mM nachgewiesen werden können. Die anfangs aufgestellte Vermutung, dass es sich bei den zusätzlichen Banden um degradierte Proteinstrukturen handeln, scheint somit wahrscheinlich zu sein. α -HIS-mM in Kombination mit rekombinantem Protein GATA-3 zeigte die gleiche Reaktivität für Proteine auf Höhe von ca. 50 kD (Ergebnis nicht gezeigt).

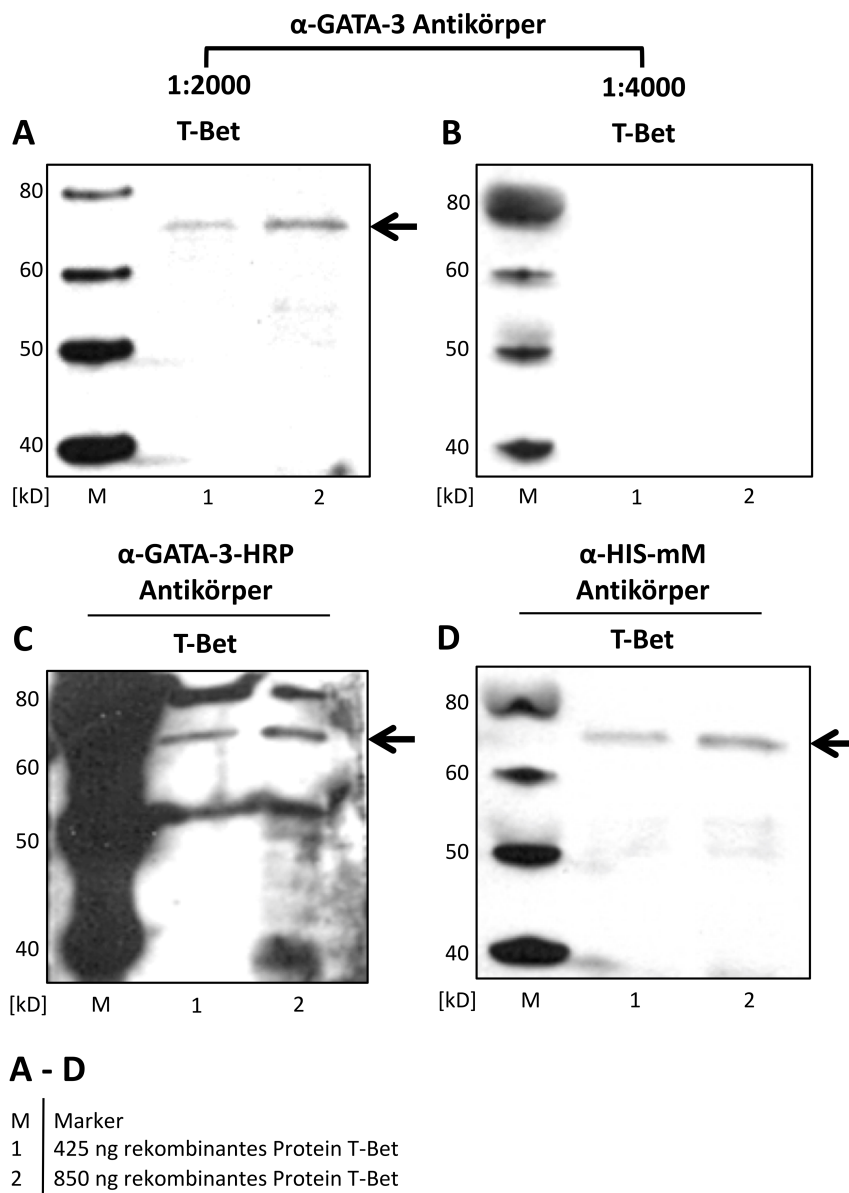


Abb. 7 Spezifitätsüberprüfung der monoklonalen Maus-Antikörper durch Test der Kreuzreaktivität

(A) α-GATA-3-mMaH 17-2-2 1:2000 zeigt bei ca. 70 kD (↔) Banden auf Höhe von T-Bet. (B) Bei einer Verdünnung von 1:4000 des gleichen Antikörpers sind keine Banden mehr zu erkennen. (C) α-GATA-3-mMaH-HRP 10-7-5 1 µg/ml zeigt bei ca. 70 kD (↔) Banden für T-Bet. (D) Das in der Produktion der monoklonalen Maus-Antikörper verwendete Poly-Histidin-Tag lässt sich bei ca. 70 kD (↔) mit α-HIS-mM 1:750 nachweisen. 10%iges Polyacrylamid-Gel

3.3 Nachweis von GATA-3 und T-Bet in humanen Vollblutproben

Im Rahmen des Kooperationsprojektes zwischen dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie - Molekulare Diagnostik der Philipps-Universität Marburg und der DRG Instruments GmbH wurden das auf Antikörpern basierende Nachweissystem für GATA-3 und T-Bet auf humane Vollblutproben übertragen.

3.3.1 Nachweis von GATA-3 und T-Bet in humanem Vollblut mit dem polyklonalen Antikörper-System

Als erster Ansatz wurde das polyklonale Antikörper-System aus 3.1.2 auf humanes Vollblut gesunder Blutspender übertragen. Die Blutproben wurden im Vorfeld 1:2 mit RIPA-Puffer lysiert und anschließend auf eine 1:10 Verdünnung mit 1xPBS eingestellt.

In Abb. 8A und B wurden humane Vollblutproben gesunder Blutspender in aufsteigender Konzentration aufgetragen. Abb. 8A zeigt das Ergebnis für die Darstellung von GATA-3 und Abb. 8B das Ergebnis für den Transkriptionsfaktor T-Bet. Mit Zunahme der eingesetzten Menge an Probe intensiviert sich das Signal bei ca. 50 kD für GATA-3 und ca. 55 kD für T-Bet. Die Negativ-Kontrollen für den jeweils 2. Antikörper sind negativ (Ergebnis nicht gezeigt).

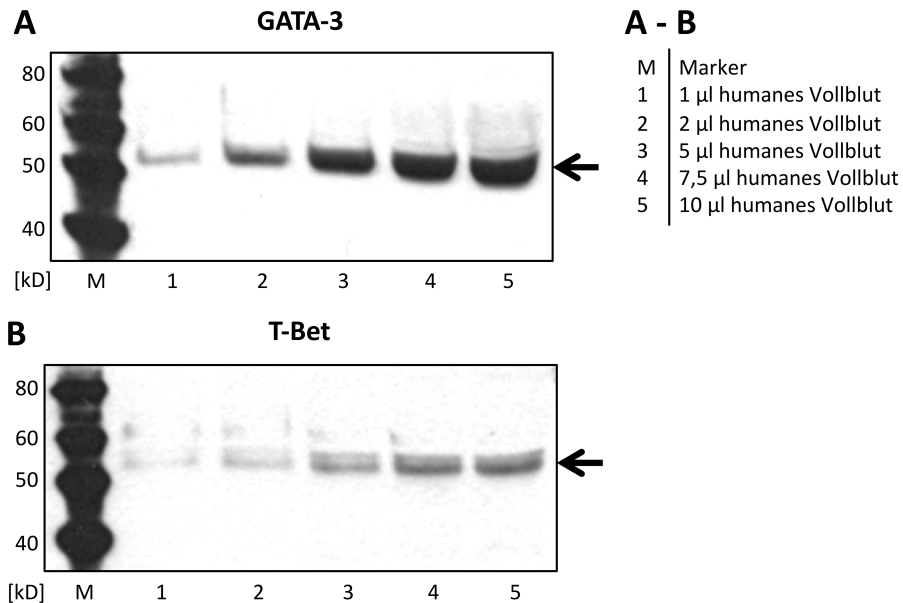


Abb. 8 Nachweis von GATA-3 und T-Bet mit dem polyklonalen Antikörper-System in humanem Vollblut

Humanes Vollblut wurde 1:2 mit RIPA-Puffer lysiert und anschließend auf 1:10 mit 1xPBS eingestellt. **(A)** Humanes Vollblut wurden mit α -GATA-3-pGαH-biot 1:1500 in Kombination mit Str-HRP 1:7500 untersucht. Bei ca. 50 kD (←) zeigen sich Banden. **(B)** Bei der Untersuchung mit α -T-Bet-pRαH 1:1000 in Kombination mit Pre-pDαR-HRP 1:15.000 zeigten sich Banden bei ca. 55 kD (←). 10%iges Polyacrylamid-Gel

3.3.2 Spike-Experiment für GATA-3 und T-Bet

Um der Fragestellung nach zu gehen, ob sich die gemessenen Signale bei ca. 50 und 55 kD durch Zugabe von rekombinantem Protein verstärken und konzentrationsabhängig im Vollblut nachweisen lassen, wurden die Proben mit definierten Mengen an rekombinantem Protein versetzt. Als Nachweissystem wurde das in 3.3.1 verwendete polyklonale Antikörpersystem verwendet.

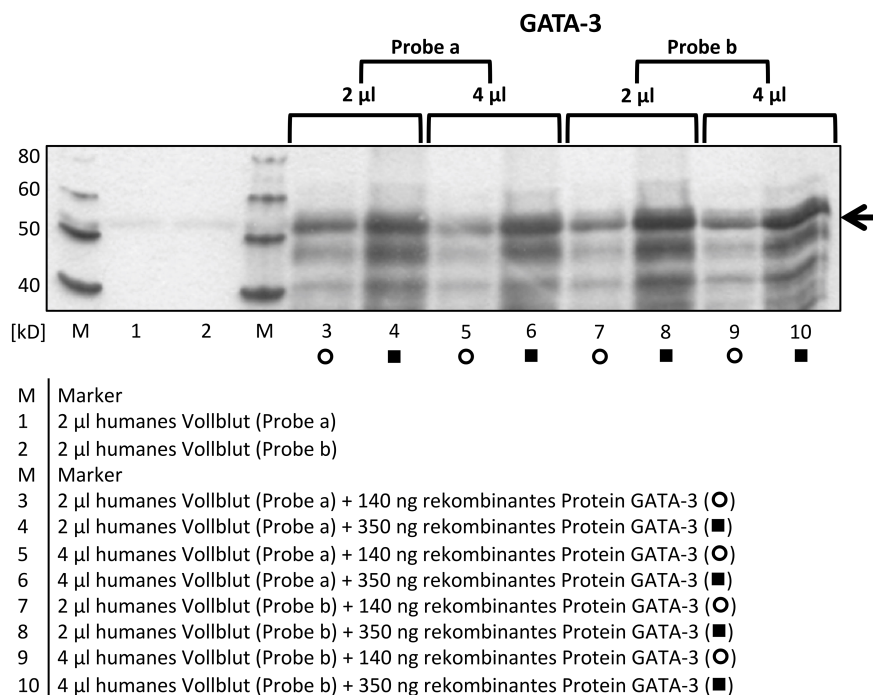


Abb. 9 Spike-Experiment für GATA-3

Humanes Vollblut wurde 1:2 mit RIPA-Puffer lysiert und anschließend auf 1:10 mit 1xPBS eingestellt. 2 µl und 4 µl zweier unterschiedlicher humaner Vollblutproben wurden mit jeweils zwei unterschiedlichen Mengen rekombantem Protein GATA-3 gespikt. Nach der Behandlung mit α-GATA-3-pGαH-biot 1:1500 in Kombination mit Str-HRP 1:7500 ist bei ca. 50 kD (←) GATA-3 nachzuweisen. 10%iges Polyacrylamid-Gel

In Abb. 9 ist das Spike-Experiment für GATA-3 zu sehen. Aufgetragen wurden zwei nicht gespikete, unterschiedliche humane Vollblutproben, sowie je 2 x 2 µl und 2 x 4 µl der humanen Vollblutprobe, die gespiket wurden mit 140 ng sowie 350 ng rekombantem Protein GATA-3. Für den Nachweis von GATA-3 in Abb. 9 sind bei ca. 50 kD Banden zu sehen. Das gespikete rekombinante Protein GATA-3 lässt sich entsprechend der zugegebenen Menge bei 50 kD in Form einer intensiveren Bande wiederfinden.

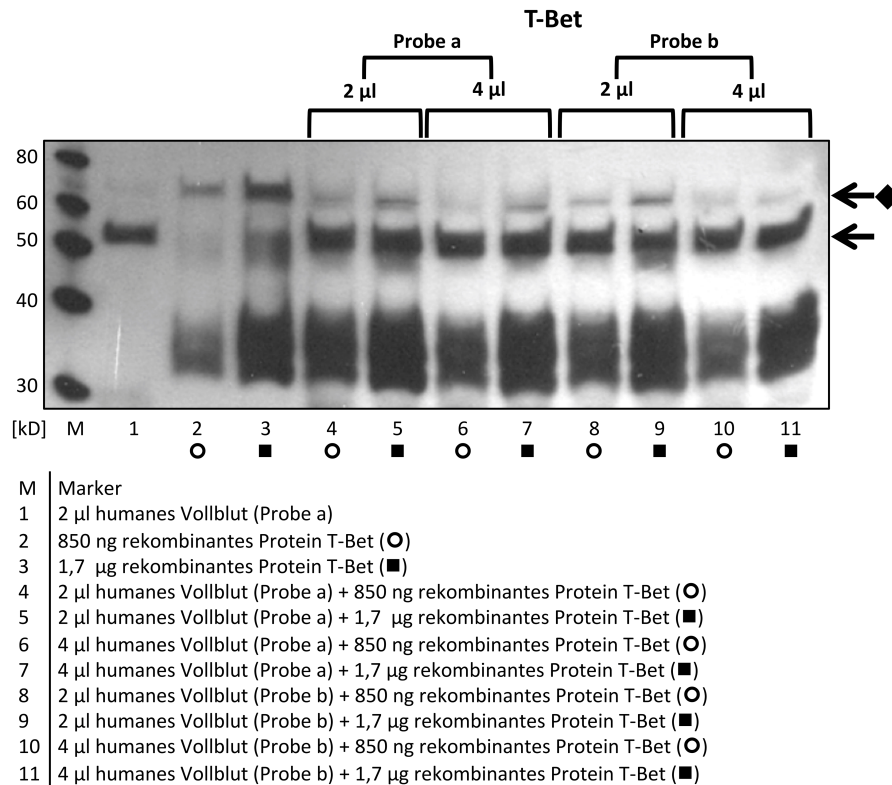


Abb. 10 Spike-Experiment für T-Bet

Humanes Vollblut wurde 1:2 mit RIPA-Puffer lysiert und anschließend auf 1:10 mit 1xPBS eingestellt. Jeweils 2 µl und 4 µl zweier unterschiedlicher humaner Vollblutproben wurden mit zwei unterschiedlichen Mengen rekombinanten Protein T-Bet gespikt. Nach der Behandlung mit α-T-Bet-pRαH 1:1000 in Verbindung mit Pre-pDaR-HRP 1:15.000 ist bei ca. 55 kD (←) T-Bet und bei ca. 70 kD (←◆) das rekombinante Protein T-Bet nachweisbar. 10%iges Polyacrylamid-Gel

In Abb. 10 ist das Spike-Experiment für T-Bet zu sehen. Aufgetragen wurde eine nicht gespikete humane Vollblutprobe, rekombinantes Protein T-Bet in den jeweils zum Spiken genutzten Mengen (850 ng und 1,7 µg rekombinantes Protein T-Bet) und das eigentliche Spike-Experiment nach dem auch schon für GATA-3 oben beschriebenen Schema. Es zeigt sich für die nicht gespikete Blutprobe ein Signal bei ca. 55 kD. Das rekombinante Protein T-Bet liefert bei ca. 70 kD entsprechend der eingesetzten Konzentration ein unterschiedlich starkes Signal. Durch diesen Unterschied ist in den gespiketen Proben sowohl eine Bande bei 55, als auch bei 70 kD zu detektieren. Das rekombinante Protein zeigt sich bei ca. 70 kD entsprechend der zugegebenen Menge an rekombinanten Protein. Grund für den Unterschied in der Signalstärke zwischen dem reinen rekombinanten Protein T-Bet und der Kombination aus humanem

Vollblut und rekombinantem Protein T-Bet in Abb. 10 könnte eine chemische und/oder physikalische Interaktion beider Komponenten sein, die zu einer Abschwächung der Signalintensität auf Höhe von ca. 70 kD und gleichzeitig zu einer konzentrationsabhängigen Intensivierung des Signales für T-Bet bei ca. 55 kD führt. Unter Verwendung des polyklonalen Antikörpersystems sind die Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-Bet in humanen Vollblutproben quantitativ, entsprechend der in diesem Experiment verwendeten Menge an rekombinantem Protein, messbar.

3.3.3 Anwendung von Pre-pRαM-HRP auf humanes Vollblut

Da Pre-pRαM-HRP, wie in 3.1.3 zu sehen ist, bisher nur für rekombinantes Protein getestet wurde, im humanen Vollblut und Gesamtprotein aus Zelltypen jedoch wesentlich mehr Bestandteile vorkommen mit denen der 2. Antikörper Pre-pRαM-HRP reagieren könnte, wurde dieser zunächst unter Verwendung von β -Aktin / monoklonal-Maus-IgG-anti-Mensch- β -Aktin (α - β -Aktin-mMaH) als Modellsystem in humanem Vollblut getestet. Pre-pRαM-HRP wurden zunächst durch eine Affinitätsaufreinigung alle Serumproteine sowie auch alle nicht spezifisch gegen die γ -Kette des Maus-IgG gerichteten Antikörper entzogen. Das Risiko einer möglichen Kreuzreaktivität gegen Bestandteile des humanen Vollblutes sollte so vermindert werden. Aktin wurde für diesen Versuch als Antigen gewählt, um unter möglichst stabilen Bedingungen durch ein hoch exprimiertes Proteins arbeiten zu können.

In Abb. 11A ist sowohl eine Bande für das Gesamtprotein aus Jurkat-Zellen als auch für die Blutproben bei ca. 42 kD sichtbar. Bei einem in der Literatur angegebenen Molekulargewicht von ca. 42 kD für β -Aktin, ist bei dem hier zu sehenden Signal bei ca. 42 kD von einer Detektion von β -Aktin auszugehen (NCBI, 2018). Wie in Abb. 11B zu sehen ist, ist für eine Verdünnung des 2. Antikörpers Pre-pRαM-HRP von 1:5000 bei einer Belichtungszeit von 30 sec keine Bande in der Negativ-Kontrolle zu beobachten. Da die Antikörpertestverfahren ursprünglich für Gesamtprotein aus Jurkat-Zellen und anderen Zellreihen etabliert wurden, kann hier die Funktionalität sowohl für das Gesamtprotein aus Jurkat-Zellen als auch in der neuen Matrix, humanes Vollblut, beurteilt werden. Beide Proteinpräparationen liefern vergleichbar

aussagekräftige Ergebnisse. Bei dem oben beschriebenen Testmodalitäten kommt es zu keiner unerwünschten Interaktion von Pre-pRαM-HRP mit den hier eingesetzten Proben bei gleichzeitig verwertbarem Signal unter Verwendung des 1. Antikörpers.

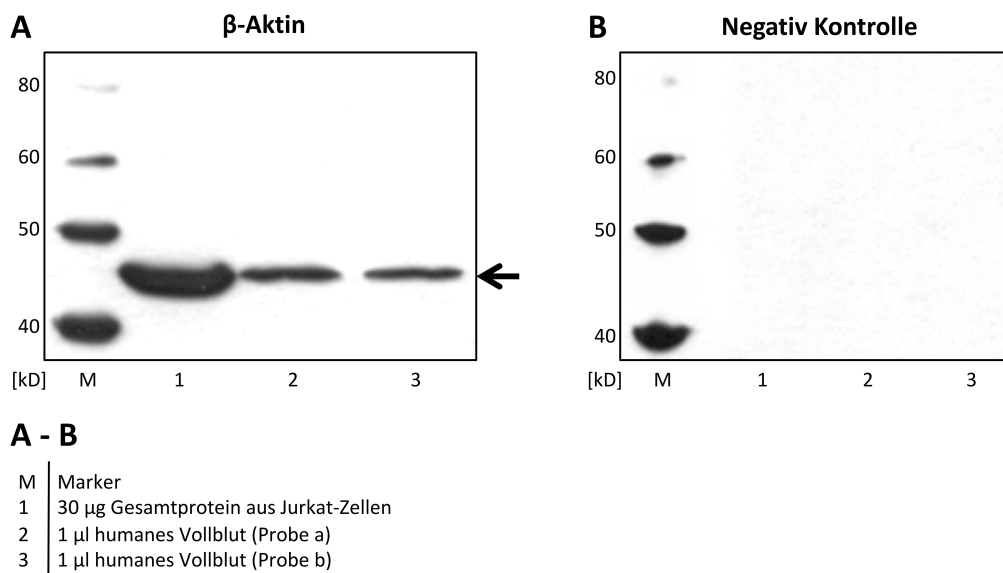


Abb. 11 Test von Pre-pRαM-HRP in humanem Vollblut

Humanes Vollblut wurde 1:2 mit RIPA-Puffer lysiert und anschließend auf 1:10 mit 1xPBS eingestellt. **(A)** In Gesamtprotein aus Jurkat-Zellen und humanem Vollblut unterschiedlicher Probanden konnte unter Verwendung von α - β -Aktin-mMαH 1:20.000 in Verbindung mit Pre-pRαM-HRP 1:7500 bei ca. 42 kD (\blackleftarrow) β -Aktin nachgewiesen werden. **(B)** Die Negativ-Kontrolle von Pre-pRαM-HRP 1:5000 zeigt unter Verwendung des gleichen Probenmaterials bei einer Belichtungszeit von 30 sec keine Banden. 10%iges Polyacrylamid-Gel

3.3.4 Nachweis von GATA-3 und T-Bet in humanem Vollblut mit monoklonalen Maus-Antikörpern und Pre-pRαM-HRP

Nachdem das System zunächst, wie in 3.1.3 dargestellt, für die rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet etabliert wurde und anschließend der 2. Antikörper Pre-pRαM-HRP einzeln noch einmal überprüft wurde (siehe 3.3.3), wurde die Kombination aus monoklonalem Maus-Antikörper und Pre-pRαM-HRP auf den Nachweis der genannten Antigene in humanen Vollblutproben übertragen.

In Abb. 12A und B ist jeweils ein Ergebnis für GATA-3 und T-Bet nach 30 min Belichtungszeit gezeigt. Sowohl mit den monoklonalen α -GATA-3-Antikörpern als auch mit den α -T-Bet-Antikörpern sind für die humanen Zelltypen HBE und Jurkat keine eindeutigen Signale für GATA-3 und T-Bet zu sehen. Für beide Zelltypen war innerhalb der Arbeitsgruppe im Vorfeld ein Nachweis der Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-Bet mit polyklonalen Antikörpern etabliert worden (Ergebnis nicht gezeigt). Die aufgetragenen humanen Vollblutproben wurden 1:2 mit RIPA-Puffer lysiert und anschließend auf 1:10 mit 1xPBS eingestellt. Jeweils 2, 3 und 4 μ l wurden aufgetragen. Bei ca. 50 kD sind für die α -GATA-3-, bei ca. 55 kD für die α -T-Bet-Antikörper Banden zu sehen. Ihre Intensität und Konzentration variiert entsprechend der aufgetragenen Proteinmenge.

Im Anschluss war eine weitere Überprüfung von Pre-pRαM-HRP notwendig, da unter Verwendung der monoklonalen Maus-Antikörper anstatt 30 sec Belichtungszeit mit bis zu 30 min Belichtungszeit gearbeitet werden musste. Erst ab ca. 30 min Belichtungszeit ließ die Intensität der Banden bei ca. 50 - 55 kD eine Beurteilung zu. Da das Bild auf dem Röntgenfilm nach Entwicklung abhängig ist von der Dauer und der Intensität der Belichtung, kann bei notwendigerweise zunehmender Belichtungszeit zur Generierung eines verwertbaren Bildes von einer geringeren Intensität der Belichtung durch die verwendeten Materialien ausgegangen werden. Dies ließe sich durch eine geringere Affinität der monoklonalen Maus-Antikörper an deren Zielprotein erklären, was wiederum weniger Bindungsmöglichkeiten für den 2. Antikörper bedeuten würde und dies würde zu einer geminderten Intensität der Belichtung des Röntgenfilmes beitragen.

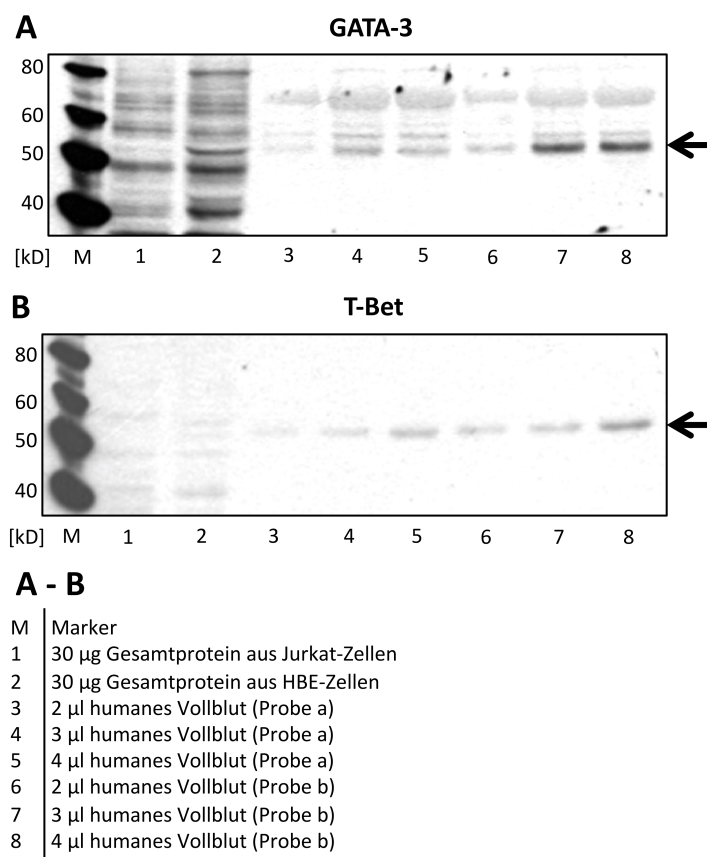


Abb. 12 Nachweis von GATA-3 und T-Bet in humanem Vollblut mit monoklonalen Maus-Antikörpern und Pre-pRαM-HRP

Humanes Vollblut wurde 1:2 mit RIPA-Puffer lysiert und anschließend auf 1:10 mit 1xPBS eingestellt. **(A)** α-GATA-3-mMaH 8-2-5 1:1500 in Verbindung mit Pre-pRαM-HRP 1:7500 zeigt für Gesamtprotein aus Jurkat-Zellen und HBE-Zellen kein eindeutiges Signal für GATA-3. In humanem Vollblut zweier unterschiedlicher Proben ist nach 30 min Belichtungszeit bei ca. 50 kD (↔) GATA-3 nachzuweisen. **(B)** Für das Gesamtprotein ist kein eindeutiges Signal unter der Verwendung von α-T-Bet-mMaH 15-2-5 1:2000 in Verbindung mit Pre-pRαM-HRP 1:7500 bei einer Belichtungszeit von 30 min zu detektieren. T-Bet ist bei ca. 55 kD (↔) in den humanen Vollblutproben nachweisbar. 10%iges Polyacrylamid-Gel

In Abb. 13A ist in aufsteigender Konzentration eine humane Vollblutprobe mit Pre-pRaM-HRP inkubiert worden. Nach Durchführung der Negativ-Kontrolle für Pre-pRaM-HRP, diesmal 30 min Belichtungszeit, waren unspezifische Banden bei ca. 50 kD präsent. Der Versuch, die Banden durch höhere Verdünnung des 2. Antikörpers zu reduzieren, ist in Abb. 13B zu sehen. Ab einer Verdünnung von 1:12.500 und einer Belichtungszeit von 30 min sind keine unspezifischen Banden mehr zu sehen.

Ursache für die prominenten Banden, selbst ohne Verwendung des 1. Antikörpers, scheint eine zu starke Affinität von Pre-pRaM-HRP zu einem Protein aus der Blutprobe zu sein, welches ein ähnliches molekulares Gewicht wie GATA-3 und T-Bet aufweist. Mit einer Molekülmasse von ca. 50 kD befinden sich die schweren Ketten der Immunglobuline auf gleicher Höhe wie das erwartete Signal für GATA-3 und T-Bet und könnte für das Signal verantwortlich sein.

Betrachtet man nun Abb. 13C und D, so ist zu sehen, dass sich bei einer Verdünnung des 2. Antikörpers von 1:12.500 unter der Verwendung von monoklonalen Maus-Antikörpern keine auswertbaren Banden bei ca. 50 - 55 kD generieren lassen. Durch die zu hohe Verdünnung des 2. Antikörpers lässt sich eine Bindung des jeweils 1. Antikörpers nicht mehr angemessen stark detektieren. Die so generierten Banden sind aufgrund ihrer variablen und inkonstanten Intensität nicht sicher zu beurteilen.

Da Pre-pRaM-HRP unter diesen Umständen nicht zu verwenden ist, wurde dieser im folgenden Versuch durch einen spezifischeren 2. Antikörper ersetzt.

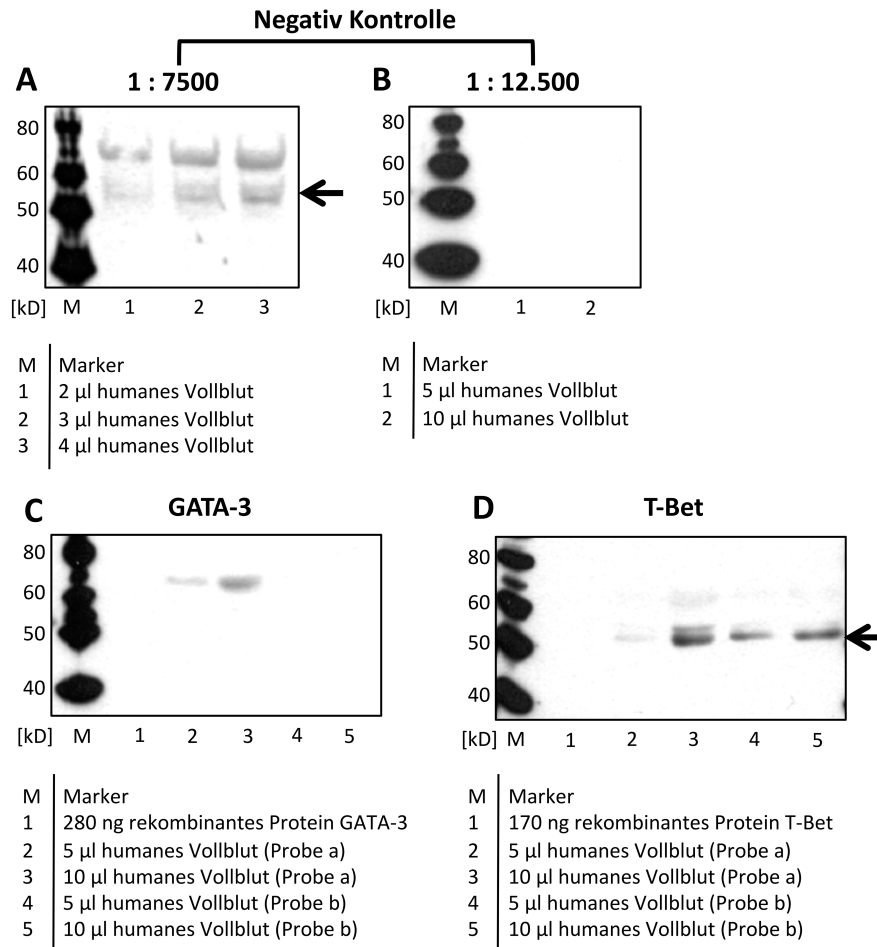


Abb. 13 Negativ-Kontrolle von Pre-pRaM-HRP

Humanes Vollblut wurde 1:2 mit RIPA-Puffer lysiert und anschließend auf 1:10 mit 1xPBS eingestellt. **(A)** Die Negativ Kontrolle von Pre-pRaM-HRP 1:7500 zeigt bei ca. 50 kD (↔) unspezifische Banden für humane Vollblutproben bei einer Belichtungszeit von 30 min. **(B)** Ab einer Verdünnung der Negativ Kontrolle von 1:12.500 des Sekundärantikörpers Pre-pRaM-HRP ist für humanes Vollblut nach einer Belichtungszeit von 30 min keine Bande mehr zu erkennen. **(C)** Rekombinantes Protein GATA-3 und GATA-3 in humanem Vollblut ist unter der Verwendung von α -GATA-3-mMaH 17-2-2 1:2000 in Verbindung mit Pre-pRaM-HRP 1:12.500 nicht nachweisbar. **(D)** Unter Verwendung von α -T-Bet-mMaH 30-1-5 1:2000 in Verbindung mit Pre-pRaM-HRP 1:12.500 ist bei ca. 55 kD (↔) T-Bet nur schwach nachweisbar. 10%iges Polyacrylamid-Gel

3.3.5 Nachweis von GATA-3 und T-Bet in humanem Vollblut mit monoklonalen Maus-Antikörpern und Pre-pGαM-κ-HRP

Im Abschnitt 3.3.4 wurde nachgewiesen, dass der 2. Antikörper Pre-pRαM-HRP für die Analytik von humanen Vollblutproben aufgrund von unspezifischer Bindung nicht verwendet werden kann. Um diese daraus resultierende Signal zu minimieren, wurde ein 2. Antikörper getestet, der spezifisch gegen die leichte Kette von Maus-Immunglobulinen gerichtet ist. Durch die vom Hersteller angegebene minimale Kreuzreaktivität gegenüber anderen Spezies, inklusive der Spezies „Mensch“, soll so eine potentielle Reaktion gegen die schwere Kette der humanen Immunglobuline vermieden werden.

In Abb. 14A - C wurden jeweils drei humane Vollblutproben in aufsteigenden Volumina aufgetragen. In Abb. 14A und B sind bei ca. 50 kD jeweils für die monoklonalen Maus-Antikörper ein Signal für GATA-3 und T-Bet zu sehen. Die Signalstärke variiert jeweils entsprechend der Menge an aufgetragener Probe und ist auch schon bei 5 µl einer 1:10 Verdünnung zu detektieren.

In Abb. 14C ist die zugehörige Negativ-Kontrolle zu sehen. Nach 25 min Belichtungszeit ist lediglich bei 5 µl einer 1:10 Verdünnung keine Bande bei ca. 50 kD zu sehen. Eine Beschränkung auf Probenvolumina unter 5µl bei Verwendung von Pre-pGαM-κ-HRP scheint notwendig zu sein, um ein unspezifisches Signal zu vermeiden und eine spezifische Detektion der Zielproteine zu gewährleisten.

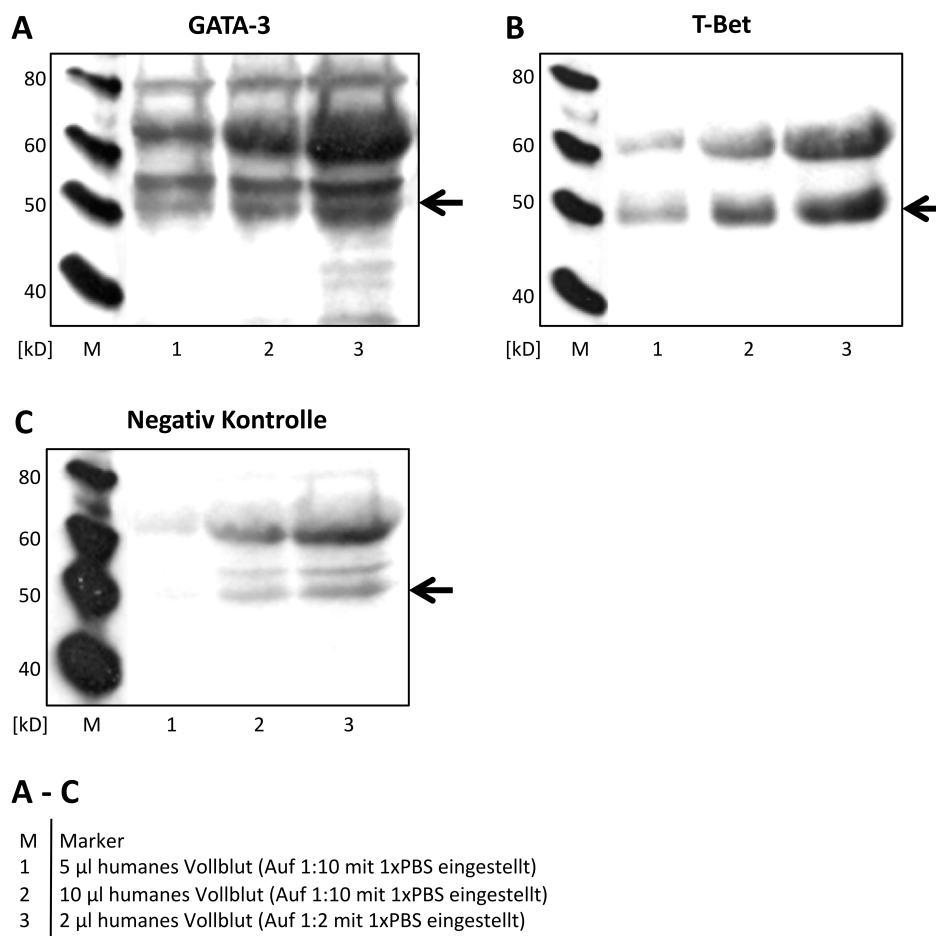


Abb. 14 Nachweis von GATA-3 und T-Bet in humanem Vollblut mit monoklonalen Maus-Antikörpern und Pre-pGαM-κ-HRP

Humanes Vollblut wurde 1:2 mit RIPA-Puffer lysiert und anschließend auf 1:10 und 1:2 mit 1xPBS eingestellt. **(A)** α-GATA-3-mMaH 10-7-5 1:1000 in Verbindung mit Pre-pGαM-κ-HRP 1:5000 zeigt bei ca. 50 kD (←) Banden für GATA-3. **(B)** α-T-Bet-mMaH 30-1-5 1:2000 in Verbindung mit Pre-pGαM-κ-HRP 1:5000 zeigt bei ca. 50 kD (←) Banden für T-Bet. **(C)** Die Negativ-Kontrolle von Pre-pGαM-κ-HRP 1:5000 zeigt bei Probenmengen über 5 µl (2 - 3) unspezifische Banden (←), bei Probenmengen von 5 µl oder geringer keine Banden. 10%iges Polyacrylamid-Gel

3.3.6 Nachweis von GATA-3 und T-Bet in humanem Vollblut mit HRP konjugierten monoklonalen Maus-Antikörpern

Eine andere Möglichkeit, die Problematik des unspezifischen Signals durch den 2. Antikörper (siehe 3.3.4 und 3.3.5) zu umgehen, war der Einsatz von direkt HRP markierten monoklonalen Maus-Antikörpern. Die verwendeten monoklonalen Maus-Antikörper der Firma BioGenes GmbH wurden von der DRG Instruments GmbH mit HRP konjugiert.

In Abb. 15 wurde rekombinantes Protein T-Bet, zwei humane Vollblutproben in aufsteigender Konzentration und Gesamtprotein des Zelltypes Jurkat auf ein Gel aufgetragen. Das rekombinante Protein T-Bet lässt sich bei ca. 70 kD nachweisen. Bei ca. 50 kD zeigen sich, der eingesetzten Konzentration an humanem Vollblut entsprechend, unterschiedlich intensive Banden. Der humane Zelltyp Jurkat zeigt keine eindeutige Bande für T-Bet mit dem eingesetzten monoklonalen Maus-Antikörper, obwohl mit dem polyklonalen Antikörpersystem innerhalb der Arbeitsgruppe die Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-Bet in Gesamtprotein aus Zelltypen nachgewiesen werden konnten.

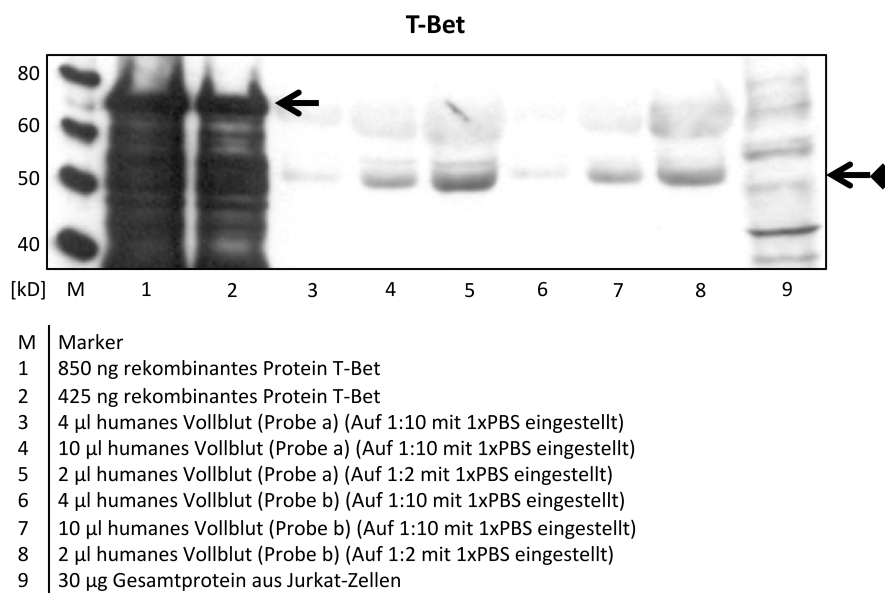


Abb. 15 Nachweis von T-Bet in humanem Vollblut mit HRP konjugierten monoklonalen Maus-Antikörpern

Humanes Vollblut wurde 1:2 mit RIPA-Puffer lysiert und anschließend auf 1:10 und 1:2 mit 1xPBS eingestellt. Rekombinantes Protein T-Bet kann mit α -T-Bet-mMaH-HRP 22-3-7 1 µg/ml bei ca. 70 kD (◀) nachgewiesen werden. In humanem Vollblut kann unter der Verwendung von α -T-Bet-mMaH-HRP 22-3-7 1 µg/ml bei ca. 50 kD (◀◆) T-Bet nachgewiesen werden. Für 30 µg Gesamtprotein aus Jurkat-Zellen ist keine spezifische Bande zu sehen. 10%iges Polyacrylamid-Gel

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines Testsystems zur Messung der Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-Bet in humanen Vollblutproben. In enger Zusammenarbeit mit dem Kooperationspartner DRG Instruments GmbH wurde von Seiten der DRG Instruments GmbH die Entwicklung eines ELISA-Testsystems und, im Rahmen dieser Arbeit, vom Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie - Molekulare Diagnostik der Philipps-Universität Marburg die Entwicklung eines Westernblot-Testsystems angestrebt.

Im Zuge der Entwicklung des Westernblot-Testsystems wurden zunächst die rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet auf ihre Reinheit und Qualität hin beurteilt, um anschließend als Grundlage für die Etablierung des auf polyklonalen und monoklonalen Antikörpern basierenden Westernblot-Testsystems verwendet werden zu können.

Im Laufe der Entwicklung des Westernblot-Testsystems wurden die eigens für dieses Projekt hergestellten monoklonalen Maus-Antikörper auf ihre Spezifität hin untersucht und auch der zur Detektion notwendige 2. Antikörper wurde den gegebenen Bedingungen nach notwendigerweise ausgewählt.

Um die Kontinuität des Kooperationsprojektes gewährleisten zu können, wurde im Verlauf der Arbeit das etablierte Westernblot-Testsystem zur Detektion der rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet zeitgleich von beiden Kooperationspartnern auf humane Vollblutproben übertragen.

4.1 Methodik

Als Basis für die Etablierung des Westernblot-Testsystems wurden die von der DRG Instruments GmbH in Auftrag gegebenen und von der Firma Trenzyme GmbH hergestellten rekombinanten Proteine der Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-Bet verwendet. Die Darstellung der Proteine mit Hilfe einer Coomassie-Brillant-Blau-Färbung (siehe Abb. 1) lässt eine optische Beurteilung der Qualität und Reinheit der verwendeten rekombinanten Proteine zu. Da neben den gewünschten Banden für GATA-3 und T-Bet noch weiteres Protein angefärbt werden konnte, können die verwendeten rekombinanten Proteine nicht als 100% rein angesehen werden.

Dass während der Herstellung der rekombinanten Proteine verwendete Vorgehen der Affinitätschromatographie und auch die genaue Übereinstimmung der von Trenzyme GmbH mitgelieferten Coomassie-Brillant-Blau-Abbildungen (Abbildung nicht gezeigt) mit der Abb. 1 legt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem zusätzlich angefärbten Protein eher um Abbauprodukte oder partielle Sequenzen der Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-Bet handelt und weniger um anderweitige Verunreinigungen. Letzteres kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Ein weiteres Indiz dafür, dass es sich bei dem zusätzlich angefärbten Protein um Abbauprodukte der Transkriptionsfaktoren handelt, ist die Möglichkeit der Anfärbung der His-Tag-Struktur durch einen α -HIS-mM-Antikörper (siehe Abb. 6). Zusätzlich ist das His-Tag mit seinen wenigen Aminosäuren ein vergleichsweise kleines Target für einen Antikörper, was für die Bindung des Antikörpers eine relativ hohe Spezifität voraussetzt. Die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Fehlbindung des Antikörpers ist somit gering und die Detektion des an das His-Tag gebundenen Proteins, in diesem Fall die Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-Bet, ist relativ hoch. Die höhere Spezifität im Vergleich zu den monoklonalen Antikörpern in Abb. 3 spiegelt sich auch in dem feineren und weniger signalintensiven Bandenmuster unter Verwendung des α -HIS-mM-Antikörpers wieder.

Sowohl mit monoklonalen (siehe Abb. 3), polyklonalen (siehe Abb. 2) und α -HIS-mM-Antikörper (siehe Abb. 6) konnte eine Bande auf Höhe von ca. 50 kD für das rekombinante Protein GATA-3 und eine Bande auf Höhe von ca. 70 kD für das

rekombinante Protein T-Bet reproduziert werden. Das von der Firma Trenzyme GmbH angegebene Molekulargewicht von 47,9 kD für GATA-3 und 58,3 kD für T-Bet stimmen mit den Daten aus Literatur und Protein-Datenbanken überein (NCBI, 2017a, 2017b). Warum das rekombinante Protein T-Bet im Westernblot auf Höhe von ca. 70 kD zu detektieren ist, obwohl vom Hersteller ein Gewicht von 58,3 kD angegeben wird, konnte von Seiten der Firma Trenzyme GmbH nicht erklärt werden. Zur weiteren Untersuchung dieser Anomalie wären vergleichende Proteinsequenzierungen und strukturelle Untersuchungen von nativen und rekombinanten Transkriptionsfaktoren mögliche zusätzliche Schritte.

Die anfänglich zur Detektion eingesetzten polyklonalen Antikörper boten den Vorteil, dass durch deren Herstellungsprozess und die damit verbundene Heterogenität der Antikörper unterschiedliche Epitope des zu detektierenden Proteins gebunden werden konnten. Dass mit dieser hohen Sensitivität verbundene Risiko von möglichen Fehlbindungen an ungewünschte Epitope anderer Proteine ließ sich in einem System mit nur einem Zielprotein weitestgehend vernachlässigen. Im Wissen um die oben beschriebenen Eigenschaften von polyklonalen Antikörpern und da das Antikörpersystem auch auf humanes Vollblut übertragen werden sollte, wurden von der DRG Instruments GmbH die Herstellung von monoklonalen Antikörpern veranlasst. Zur Immunisierung der im Herstellungsprozess verwendeten Mäuse wurden die oben beschriebenen rekombinanten Proteine der Firma Trenzyme GmbH verwendet. Da für den Immunisierungsprozess lediglich die aufgereinigten ca. 50 kD (GATA-3) und ca. 70 kD (T-Bet) schweren Bestandteile der Proben verwendet wurden, kann ein Einfluss des vornehmlich degradierten Proteins auf den Immunisierungsprozess weitestgehend ausgeschlossen werden. Die anschließend isolierten und immortalisierten B-Zellen gewährleisteten somit die Produktion von Antikörpern, die in ihrem Verhalten hoch spezifisch gegen ein Epitop des gewünschten Zielproteins gerichtet sind. Die Qualität der so hergestellten Antikörper wurde von der Firma Trenzyme GmbH überprüft.

Da zum einen in der zur Immunisierung verwendeten Probe trotzdem unerwünschte Proteinverunreinigungen vorhanden gewesen sein könnten und zum anderen auch die Möglichkeit bestand, dass im Rahmen der Verarbeitung

des Antigens durch die verwendeten Medien und Puffer sterische oder enzymatische Veränderungen stattgefunden haben, wurde die Spezifität der monoklonalen Antikörper zusätzlich untersucht.

Um eine verlässlichere Aussage über die generelle Spezifität der monoklonalen Antikörper gegenüber den Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-Bet treffen zu können, wurde deren Verhalten unter Verwendung von rekombinantem Protein eines anderen Herstellers (Abnova Corporation) getestet. Im Verlauf dieser Versuchsreihe (siehe 3.2.1) war es nicht möglich mit den monoklonalen Antikörpern zur Detektion von GATA-3 das rekombinante Protein GATA-3 der Firma Abnova Corporation nachzuweisen. Für die α -T-Bet-Antikörper war dies problemlos möglich. Ähnlich wie für das rekombinante Protein T-Bet der Firma Trenzyme GmbH ist das rekombinante Protein T-Bet der Firma Abnova Corporation nicht bei einem Molekulargewicht von 58,3 kD zu detektieren, sondern bei ca. 80 kD. Eine Erklärung von Seiten der Firma Abnova Corporation konnte nicht eingeholt werden. Zur Überprüfung der Spezifität der monoklonalen Antikörper wurde das Experiment zur Kreuzreaktivität durchgeführt (siehe 3.2.2). Es zeigte sich, dass die monoklonalen Antikörper zur Detektion von GATA-3 auch in der Lage sind das rekombinante Protein T-Bet zu detektieren. Eine Erkennung von Bestandteilen (bakterielle Proteine) aus dem zur Herstellung beider Transkriptionsfaktoren verwendeten identischen Expressionssystem wäre eine mögliche Erklärung für das unspezifische Bindungsverhalten. Rekombinantes Protein GATA-3 konnte mit Hilfe der monoklonalen Antikörper gegen T-Bet dagegen nicht nachgewiesen werden. Das unspezifische Bindungsverhalten der α -GATA-3-Antikörper ließ sich durch höhere Verdünnungen beseitigen (siehe 3.2.2). Die zu hohe Konzentration der α -GATA-3-Antikörper und die damit verbundene Übersättigung des Nachweissystems ist eine mögliche Erklärung für das unspezifische Bindungsverhalten, da es bei zu hohen Konzentrationen innerhalb eines Systems zu spontanen chemischen, physikalischen und molekularen Wechselwirkungen zwischen einzelnen Bestandteilen kommen kann.

Die Spezifität der monoklonalen Antikörper zur Detektion von GATA-3 muss nach diesen Versuchen in Frage gestellt werden. Zur weiteren Überprüfung des

Bindungsverhaltens der monoklonalen Antikörper für den Transkriptionsfaktor GATA-3 wurde von der DRG Instruments GmbH ein Epitop-Mapping durchgeführt. Hierbei konnte genauer überprüft werden, welche Zielstruktur die monoklonalen Antikörper zur Detektion von GATA-3 erkennen und binden. Mit dieser Untersuchung konnte die Spezifität der monoklonalen Antikörper zur Detektion von GATA-3 für einzelne Bereiche des rekombinanten Proteins GATA-3 nachgewiesen werden.

Im Zuge des Kooperationsprojektes wurden von beiden Parteien parallel die gleichen Fragestellungen mit Hilfe von unterschiedlichen Methoden bearbeitet. Trotz der oben beschriebenen Probleme wurde im Zuge der intensiven Zusammenarbeit und insbesondere auf Bestreben der DRG Instruments GmbH im Hinblick auf die Fertigstellung des ELISAs das Nachweissystem auf die Matrix humanes Vollblut übertragen.

Die Übertragung des polyklonalen Antikörper-Systems zur Analyse der Faktoren in der Matrix humanes Vollblut war problemlos möglich (siehe 3.3.1) und auch im Spike-Experiment ließ sich mit Hilfe von zugegebenem rekombinantem Protein eine konzentrationsabhängige Signalamplifikation der Banden für GATA-3 und T-Bet im humanen Vollblut erreichen (siehe 3.3.2). Da zwischen dem nativen T-Bet der Vollblutprobe bei ca. 55 kD und dem eingesetzten rekombinanten Protein T-Bet auf Höhe von ca. 70 kD ein etwa 15 kD schwerer Unterschied bestand, sind aus diesem Versuchsteil nur bedingt Aussagen ableitbar. Dennoch stimmen die prominenten Banden auf Höhe von ca. 50 kD für natives GATA-3 und bei ca. 55 kD für natives T-Bet mit den in der Literatur üblichen Werten für GATA-3 und T-Bet überein (NCBI, 2017a, 2017b).

Nach der Spezifitätsüberprüfung des 1. Antikörpers und gerade im Hinblick auf die Arbeit mit humanen Vollblutproben, erschien es sinnvoll, auch den 2. Antikörper einer genaueren Untersuchung zu unterziehen. Grund hierfür war der Umstand, dass im Vergleich zu rekombinantem Protein und reinen Zelltypen in einer humanen Vollblutprobe eine höhere Vielfalt an Proteinen vorkommt, die potentiell als Störfaktor die Messung beeinflussen können. Die anfängliche Testung des 2. Antikörpers Pre-pRαM-HRP war bei der zu verwendenden

Belichtungszeit für das hoch exprimierte Protein β -Aktin unauffällig (siehe 3.3.3), zeigte jedoch bei notwendigerweise längeren Belichtungszeiten bei der Detektion der Transkriptionsfaktoren unter Verwendung von humanem Vollblut in der Negativ-Kontrolle unspezifische Banden (siehe 3.3.4). Obwohl sich die unspezifische Signalamplifikation in der Negativ-Kontrolle durch höhere Verdünnung des 2. Antikörpers verhindern ließ, war die eigentliche Detektion von GATA-3 und T-Bet unter diesen Versuchsbedingungen nicht mehr möglich. Die Unterschiede in der Belichtungszeit können als Indiz dafür gewertet werden, dass prozentual nur eine sehr geringe Menge an messbarem Transkriptionsfaktor in der Blutprobe vorhanden ist.

Als mögliche Fehlerquelle und unspezifischer Bindungspartner auf Höhe von ca. 50 kD kommt die schwere Kette des IgGs mit 50 kD in Frage. IgG setzt sich aus jeweils zwei schweren und zwei leichten Ketten zusammen. Es gibt unterschiedliche schwere und leichte Ketten, die in Ihrem Molekulargewicht zwischen 50 - 70 kD für die schwere Kette und um ca. 25 kD für die leichte Kette variieren (Cohen et al., 1967). Um das Risiko einer möglichen unspezifischen Bindung des 2. Antikörpers an Bestandteile des humanen IgGs, insbesondere an die schwere Kette des IgG, zu verhindern, wurde ein neuer 2. Antikörper (Pre-pGaM- κ -HRP) gewählt. Während der Herstellung von Pre-pGaM- κ -HRP wurden aus dem Produktionsansatz alle Antikörper entfernt, die mit Strukturen der schweren Kette von IgG reagieren könnten. Eine mögliche Fehlbindung sollte nun potentiell nur noch auf Höhe von ca. 25 kD, also entfernt vom eigentlichen Messbereich, möglich sein.

Bei Verwendung des neuen 2. Antikörpers in humanem Vollblut zeigten sich dennoch unspezifische Banden auf Höhe von ca. 50 kD in der Negativ-Kontrolle (siehe 3.3.5). Als Ursache wurde eine Übersättigung des Systems mit zu hohen Probenvolumina angenommen. Mit einer Reduktion der Probenvolumina auf Mengen unter 5 μ l ließ sich das unspezifische Bindungsverhalten des 2. Antikörpers vermeiden.

Eine weitere Möglichkeit das Problem der Signalamplifikation des 2. Antikörpers zu umgehen, war der Verzicht auf selbigen durch direkte Koppelung des 1. Antikörpers mit HRP. Die Anwendung dieser Antikörper auf rekombinantes Protein und humanes Vollblut zeigte mit den voran gegangenen Versuchen

identische Ergebnisse (siehe 3.1.5 und 3.3.6). Neben den oben beschriebenen bestehenden Bedenken bezüglich der Spezifität der Antikörper besteht darüber hinaus in diesem Fall das potentielle Problem, dass es durch die direkte Verbindung von HRP mit dem Antikörper zu sterischen Wechselwirkungen mit der Antikörperbindungsstelle kommen kann, die wiederum das Bindungsverhalten und somit die Spezifität des Antikörpers weiter beeinflussen könnte.

Da es sich bei humanem Vollblut um eine hochkomplexe Mischung aus Zellen, Zellbestandteilen und gelösten Proteinen handelt, wäre die Anwendung von verschiedenen Verfahren der Proben Vor- und Aufarbeitung zur Reduktion dieser komplexen Problemstellung denkbar. Da es sich bei den Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-Bet um primär nukleäre Proteine handelt, könnte deren Zugänglichkeit für die verwendeten Antikörper während der Testung durch unterschiedliche Zell-Lyseverfahren optimiert werden und auch die Reduktion von potentiell störenden Faktoren wäre durch maschinelle und chemische Bearbeitung möglich.

Zur weiteren Validierung der monoklonalen Antikörper erscheinen zusätzliche Experimente angebracht. Neben dem oben beschriebenen Epitop-Mapping sind ebenso weitere Untersuchungen bezüglich der Affinität der monoklonalen Antikörper sinnvoll.

Nach dem Nachweis der reinen Zielstruktur, durchgeführt als Nachweis der rekombinanten Transkriptionsfaktoren, sollte mit zunehmender Komplexität und in absteigender Konzentration der Transkriptionsfaktoren innerhalb der Proben das Nachweissystem auf weitere Ausgangsmaterialien übertragen werden. Exemplarisch wurde in Abschnitt 3.3.4 und 3.3.6 der Versuch unternommen, die Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-Bet in unterschiedlichen Zelltypen nachzuweisen, jedoch ohne Erfolg. Denkbar wäre der Nachweis in T_h1/T_h2 -Zelltypen mit vergleichsweise hoher Konzentration der Transkriptionsfaktoren und anschließend die Ausweitung auf komplexere Proteinpräparationen wie z.B. aus mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC). Der Versuch der Detektion von GATA-3 und T-Bet in humanem Vollblut kann anschließend als anspruchsvollster Ansatz gewertet werden. Im Verlauf dieser Versuchsreihen

wäre sicherlich auch die Ermittlung der Detektionsgrenze der Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-Bet möglich und somit eine allgemeine Aussage über die Sensitivität des Westernblot-Nachweissystems denkbar.

Eine generell hohe Sensitivität ließ sich von Seiten der DRG Instruments GmbH mit deren ELISA erreichen. Die hohe Sensitivität eines ELISA wird durch die Methodik dieses Testverfahrens erreicht. Zum einen kann mit geringeren Probenvolumina gearbeitet werden, da die Auswertung photometrisch und nicht optisch, wie beim Westernblot, erfolgt und zum anderen werden durch mehrere Waschvorgänge weitestgehend all die Substanzen aus dem ELISA-Testsystem entfernt, die nicht durch das System erkannt werden sollen. Zum Ende des Kooperationsprojektes war es der DRG Instruments GmbH daher möglich, die Arbeit an einem ELISA zur Detektion der Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-Bet fertig zu stellen. Direkte Aussagen zur Spezifität der einzelnen Komponenten des ELISAs sind jedoch nicht aus den Ergebnissen des ELISAs konkret ableitbar. Zur besseren Beurteilbarkeit der Spezifität sollten neben den in dieser Arbeit geschilderten Überlegungen und Versuchen noch weitere Überprüfungen der einzelnen Antikörper und verwendeten Materialien durchgeführt werden.

4.2 Ausblick

Die Entwicklung eines diagnostisch verwertbaren Testsystems ist ein Teil dessen, was in den letzten Jahren zunehmend unter dem Konzept der stratifizierten bzw. personalisierten Medizin unter anderem diskutiert wird. Der Begriff „personalisierte Medizin“ beschreibt die Auswahl und Anwendung einer Therapie für einen Patienten entsprechend dessen individuellen Voraussetzungen und Bedürfnissen basierend auf speziellen Testverfahren. Berücksichtigt wird hier Genetik, Biomarker, Endotyp, Phänotyp, und auch psychosoziale Aspekte. Impliziert wird bei diesem Vorgehen unter anderem auch der Aspekt der Ressourcenschonung, gerade auch im Hinblick auf die steigenden Kosten unseres Gesundheitswesens, sowie möglichst die

Minimierung von Nebenwirkungen unter der Therapie. (Agusti et al., 2015; Jameson et al., 2015)

Vor Entwicklung eines optimalen Testverfahrens steht jedoch die Identifikation der relevanten und zu testenden Biomarker. Biologische Marker / Biomarker sind messbare Substanzen oder Zustände, die in der Beurteilung von Organfunktionen oder allgemein dem Gesundheitszustand Anwendung finden (Lapraz et al., 2013). Medizinische Biomarker können Auskunft geben über die Pathophysiologie einer Erkrankung, deren Ursache und den möglichen Effekt einer Therapie (Frank et al., 2003). Im Idealfall sind sogar die Aussagen möglich, ob eine Krankheit aktiv oder inaktiv ist, über deren Schweregrad, eine mögliche Krankheitsprogression und welche Therapie am wirkungsvollsten wäre (Berry et al., 2016). Anwendung findet dieses Konzept beispielsweise bereits in den Leitlinien zur Therapie von schwerem bzw. unkontrolliertem Asthma. Hier wird angeraten, die Gabe von Corticosteroiden an die Eosinophilie, gemessen im Sputum der Patienten, anzupassen (Chung et al., 2014; R. H. Green et al., 2002). Im Rahmen der Forschung zu Asthma sind eine Reihe von Biomarkern entdeckt worden (Wadsworth et al., 2013; Zissler et al., 2016). Bezüglich der größten Untergruppe, dem allergischen bzw. T_H2-vermittelten Asthma bronchiale, sind bisher jedoch nur wenige von praktischer Relevanz. Hierzu zählen die Messung der eosinophilen Granulozyten in Blut und / oder Sputum, die Stickstoffmonoxid-Fraktion in der Ausatemluft (FeNO) sowie die Messung von Periostin und IgE (Berry et al., 2016). Alle 4 Marker korrelieren mehr oder weniger mit dem Schweregrad der Symptome des Patienten und dem Ansprechen auf eine Corticosteroidtherapie (Brusselle et al., 2013; Ciprandi et al., 2017; Jacobsen et al., 2007; Malinovski et al., 2013; Pizzichini et al., 1997; Ricciardolo et al., 2015; Szeffler et al., 2012; Wagener et al., 2015; Woodruff et al., 2007). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diese Biomarker nicht nur mit dem Schweregrad und dem Ansprechen der bereits etablierten Therapieoptionen korrelieren, sondern auch als Entscheidungsgrundlage, auf Basis des Konzepts der personalisierten Therapie, für oder gegen eine Therapie mit neuen Medikamenten angewendet werden können (Hanania et al., 2011, 2013; Tajiri et al., 2016). Im Bereich des Nicht-T_H2 vermittelten Asthma bronchiale und einer zugrundeliegenden T2^{LOW}-Entzündungsreaktion werden unter anderem IL-8 und IL-17 sowie Myeloperoxidase und neutrophile Elastase als mögliche Biomarker

in Studien überprüft (Licari et al., 2017; Samitas et al., 2017; F. Schleich et al., 2016). In Analogie zu der Messung der Eosinophile im Sputum für das T_H2 vermittelte Asthma bronchiale wird als Biomarker für das Nicht-Th2 vermittelte Asthma bronchiale die Neutrophilie im Sputum verwendet. Darüber hinaus konnte in Studien eine vermehrte Aktivität der immunologischen Mechanismen vom Typ 1 (Th1) und Typ 3 (Th17) (siehe Abschnitt 1.1.5) bei Patienten mit einer Nicht-T_H2 vermittelten Asthma bronchiale und einer T2^{LOW}-Entzündungsreaktion festgestellt werden (McKinley et al., 2008; Samitas et al., 2017; Thomson, 2016).

Wie oben beschrieben stehen demnach sowohl für das T_H2 vermittelte, als auch für das Nicht-T_H2 vermittelte Asthma bronchiale Biomarker zur Verfügung, wobei deren praktische Anwendung bisher vornehmlich im Bereich des T_H2 vermittelten Asthma bronchiale möglich ist. Mit der in dieser Arbeit beschriebenen Entwicklung eines Testsystems zur Detektion von GATA3 und T-Bet ist nun ein Testsystem zur Detektion von Biomarkern auf Ebene der für die Entwicklung von T_H2- und T_H1-Zellen verantwortlichen Transkriptionsfaktoren verfügbar. Ob sich jedoch genaue Aussagen aus den Messwerten im Blut ableiten lassen, muss durch nachfolgende Studien erst belegt werden.

Fraglich ist auch, ob die Messung von GATA-3 und T-Bet aus anderen Medien als aus Blut zielführender wäre. Gerade im Hinblick auf die Erkenntnis, dass GATA-3 und T-Bet zwar die wichtigsten Transkriptionsfaktoren für die Entwicklung von T_H2- und T_H1-Zellen, jedoch auch an der Entwicklung von CD8+ T-Zellen, B-Zellen, Mastzellen und Zellen des angeborenen Immunsystems beteiligt sind (Kallies et al., 2017; Muehling et al., 2017). Hier könnte sich die Messung in lokal entzündlich veränderten biologischen Materialien, wie zum Beispiel in Sputum oder bronchoalveolärer Lavage (BAL) Flüssigkeit, als zielführender erweisen. Dennoch sollte bei der Wahl des Probenmaterials immer ein sinnvoller Kompromiss zwischen der zu erwartenden Aussagekraft der Ergebnisse und der Invasivität, also der Belastung für den Patienten, gefunden werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Formen von Zellpopulationen existieren, die gleichzeitig unterschiedliche Transkriptionsfaktoren exprimieren (Muehling et al., 2017). Die Ausweitung der Messmethode auf weitere Transkriptionsfaktoren und deren Verhältnis zueinander wäre eine denkbare Erweiterung der diagnostischen Beurteilung.

Alle oben beschriebenen bekannten und etablierten Biomarker können als Folge der pathophysiologischen Veränderungen von Asthma bronchiale begriffen werden (Berry et al., 2016). Diese speziellen pathophysiologischen Veränderungen wiederum sind die Grundlage für die Definition von Endotypen (Lötvall et al., 2011). Ein Endotyp einer Erkrankung beschreibt eine Untergruppe der Krankheit basierend auf möglichst eindeutigen und reproduzierbaren pathophysiologischen Vorgängen, wie zum Beispiel zelluläre und/oder molekulare Vorgänge und Interaktionen, sowie deren Reaktion auf therapeutische Interventionen (G. P. Anderson, 2008). In Analogie zu den in 1.1.4 beschriebenen Phänotypen und den in 1.1.5 beschriebenen pathophysiologischen Vorgängen lassen sich drei dominierende Endotypen definieren: Ein Typ 2 getriebener Endotyp, ein Nicht-Typ 2 getriebener Endotyp und ein Endotyp bestehend aus Typ 2 und Th17-Zellen (Ioana Agache et al., 2016). In den letzten Jahren war die Erweiterung und Konkretisierung dieser Einteilung der Endotypen Gegenstand intensiver Forschung (Ioana Agache, 2015; Ioana Agache et al., 2015; C.-H. S. Kuo et al., 2017; Raundhal et al., 2015; Simpson et al., 2007; Truyen et al., 2006). Insbesondere Patienten, die unter einer schweren und therapeutisch ungenügend kontrollierten Form des Asthma bronchiale leiden, werden nach den in 1.1.5 beschriebenen T2^{HIGH}- und T2^{LOW}-Entzündungsreaktionen in einen T2^{HIGH}- und einen T2^{LOW}-Endotyp eingeteilt (Ioana Agache et al., 2016; Samitas et al., 2017). Als Definitionskriterien werden häufig symptomauslösende Zelltypen und deren Zytokine als Biomarker herangezogen (Ciprandi et al., 2017). Zur Detektion von Patienten mit einem T2^{LOW}-Endotyp wird unter anderem das Vorkommen von neutrophilen Granulozyten im Sputum gemessen, wobei der Cut-Off-Wert nicht einheitlich definiert ist (R. Green et al., 2002; Moore et al., 2014; F. N. Schleich et al., 2013). Darüber hinaus sind die pathophysiologischen Mechanismen zur Entstehung und Aufrechterhaltung einer neutrophilen Entzündungsreaktion bei Patienten mit Asthma bronchiale aktueller Gegenstand der Forschung und eine durch Th1-Zellen vermittelte Entzündungsreaktion wird neben anderen Mechanismen diskutiert (Samitas et al., 2017; Thomson, 2016). Als Alternative zu der Messung der neutrophilen Granulozyten würde sich möglicherweise im Kontext der Endotypisierung die Messung grundlegenderer Zelltypen, z.B. Th1- und Th2-Zellen, anhand deren Transkriptionsfaktoren anbieten. Mit dem in dieser

Arbeit etablierten Nachweisverfahren für die Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-Bet ließe sich die Endotypisierung auch auf pathophysiologische Ebenen ausweiten, deren Veränderung weit vor der klinischen Manifestation durch Zellen und deren Metaboliten, in der Kaskade von Ereignissen für die Entstehung von Asthma bronchiale, eine Rolle spielen.

Über die Messung der Transkriptionsfaktoren und deren Verhältnis zueinander wäre nicht nur eine Zuordnung der Patienten zu entsprechenden Endo- oder Phänotypen denkbar, sondern auch die Überprüfung der Krankheitsaktivität und -progression wäre auf einer molekularen Ebene möglich. Darüber hinaus war die Messung des Zustandes bei oder sogar vor Entstehen der Erkrankung Asthma bronchiale bislang nur schwer zu realisieren. Mit der Messung der Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-Bet wäre es möglich, Veränderungen des Gleichgewichtes zwischen T_H1- und T_H2-Zellen zu beschreiben. Weitere Studien müssen zeigen, ob so evtl. noch vor der ersten klinischen Manifestation messbare Veränderungen sichtbar sind, auf die eventuell mit neuen Therapien oder Präventionsstrategien frühzeitig Einfluss genommen werden könnte.

Die etablierten therapeutischen Grundprinzipien für Asthma bronchiale wurden in 1.1.2 bereits erklärt. In den letzten Jahren wurden zunehmend Anstrengungen unternommen, um neue Medikamente zur Therapie von Asthma bronchiale zu entwickeln. Insbesondere im Bereich des T_H2 vermittelten Asthma bronchiale und der zugrundeliegenden T2^{HIGH}-Entzündungsreaktion wurden vermehrt neue Medikamente in Studien überprüft (Papi et al., 2017). Bereits als Therapieoption für Patienten auch außerhalb von Studien zugänglich ist zum einen der gegen IgE gerichtete Antikörper Omalizumab (Busse et al., 2011; Hanania et al., 2013; Normansell et al., 2014; Teach et al., 2015) und zum anderen die Antikörper Mepolizumab und Reslizumab, die gegen das Zytokin IL-5 gerichtet sind (Bel et al., 2014; Bjermer et al., 2016; Castro et al., 2015; Corren et al., 2016; Ortega et al., 2014, 2016). Im Rahmen von klinischen Studien werden momentan weitere Antikörper-Therapien untersucht, deren Target-Moleküle ebenfalls vornehmlich Teil der T2^{HIGH}-Entzündungsreaktion sind. Angriffspunkt der neuen Antikörper-Therapien sind unter anderem die α -Kette des IL-5-Rezeptors (durch Benralizumab), Interleukin 13 (durch Lebrikizumab und Tralokinumab), die α -Untereinheit des IL-4-Rezeptors (durch Dupilumab) und weitere Moleküle (Bleecker et al., 2016; C. E. Brightling et al., 2015; Hanania et al., 2016;

Parameswaran Nair et al., 2017; Quirce et al., 2017; Santini et al., 2017; S. Wenzel et al., 2016). Neue Therapieansätze für Patienten mit Nicht- T_H2 vermittelten Asthma bronchiale und gegen die in diesem Fall vorherrschende $T2^{LOW}$ -Entzündungsreaktion waren bisher wenig erfolgreich. Ein anfänglich vielversprechender Therapieansatz gegen $TNF\alpha$ zeigte in Folgestudien eine erhöhte Infektanfälligkeit sowie eine Steigerung des Krebsrisikos und auch andere Therapiestrategien auf diesem Gebiet zeigten kaum positive Resultate (C. Brightling et al., 2008; O'Byrne et al., 2016).

Zunehmend kommt es zu einer Erweiterung des Spektrums der potentiellen Target-Moleküle. Die oben beschriebenen Ansätze richten sich weitestgehend gegen Moleküle, die eher spät in der Kaskade von Ereignissen eine Rolle spielen, welche schlussendlich zu dem Symptomkomplex führen, den wir als Asthma bronchiale beschreiben. Neuere Ansätze richten sich gegen Bestandteile intrazellulärer Stoffwechselprozesse und Signalkaskaden, deren Aktivität zur Expression von Genen und der Aktivierung und Aufrechterhaltung genau der Entzündungsreaktion führt, welche auf pathophysiologischer Ebene verschiedene Endotypen von Asthma bronchiale definieren (da Silva et al., 2016; Guntur et al., 2012; Licari et al., 2017; Thomson, 2016, 2017). Insbesondere in der sich durch eine Neutrophilie auszeichnenden Untergruppe der $T2^{LOW}$ -Entzündungsreaktion werden neue Wirkstoffe in Studien überprüft. Hierzu zählen der C-X-C motif chemokine receptor 2 (CXCR2)-Antagonist, 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP)-Inhibitoren, Prostaglandin E3/E4 und weitere Proteinkinase-Inhibitoren (Chaudhuri et al., 2014; P Nair et al., 2012; O'Byrne et al., 2016; Thomson, 2016). Vielversprechend ist auch ein neuer therapeutischer Ansatz, der die mRNA des Transkriptionsfaktors GATA-3 als Zielstruktur verändert und somit als mögliches Therapeutikum im Bereich der $T2^{HIGH}$ -Entzündungsreaktion angewandt werden könnte. Bei dem neuen Medikament, welches bereits erfolgreich in Studien getestet wurde, handelt es sich um ein katalytisch aktives DNA-Molekül, ein sogenanntes DNAzym (Potaczek et al., 2016). Bei dem Medikament SB010 mit der aktiven Struktur hgd40 handelt es sich um ein kurzes DNA-Molekül, welches in der Lage ist, aufgrund seiner Struktur zielgerichtet eine vorab definierte Stelle der mRNA zur Herstellung von GATA-3 innerhalb der Zelle zu binden und diese dann selbstständig katalytisch zu schneiden (Homburg et al., 2015; Krug et al., 2015).

Mit diesem Medikament könnte nicht nur auf die manifeste Krankheit und deren Symptome, sondern erstmals auch auf die Entstehungsmechanismen von Asthma bronchiale Einfluss genommen werden (Sel et al., 2008). Wäre es möglich, noch vor Ausbruch der Erkrankung Asthma bronchiale Veränderungen einzelner Zelltypen oder deren Verhältnis untereinander anhand deren Transkriptionsfaktoren festzustellen, so wäre denkbar, dass mit dem Einsatz neuer Medikamente frühzeitig regulierend in die beginnenden pathophysiologischen Prozesse eingegriffen werden könnte. Weitere Studien müssen klären, ob so individuelle Therapiestrategien mildernd auf den Verlauf der Erkrankung einwirken, oder gar gänzlich den Ausbruch einer Erkrankung verhindern könnten.

5 Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K., Murphy, K. M., & Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383(6603), 787–793.
- Agache, I. (2015). Non-eosinophilic Asthma Endotypes. *Current Treatment Options in Allergy*, 2(3), 257–267.
- Agache, I., & Akdis, C. A. (2016). Endotypes of allergic diseases and asthma: An important step in building blocks for the future of precision medicine. *Allergology International*, 65(3), 243–252.
- Agache, I., Akdis, C., Jutel, M., & Virchow, J. C. (2012). Untangling asthma phenotypes and endotypes. *Allergy*, 67(7), 835–846.
- Agache, I., Sugita, K., Morita, H., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2015). The Complex Type 2 Endotype in Allergy and Asthma: From Laboratory to Bedside. *Current Allergy and Asthma Reports*, 15(6), 29.
- Agusti, A., Anto, J. M., Auffray, C., Barbe, F., Barreiro, E., Dorca, J., Escarrabill, J., Faner, R., Furlong, L. I., Garcia-Aymerich, J., Gea, J., Lindmark, B., Monso, E., Plaza, V., Puhan, M. A., Roca, J., Ruiz-Manzano, J., Sampietro-Colom, L., Sanz, F., Serrano, L., Sharpe, J., Sibila, O., Silverman, E. K., Sterk, P. J., & Sznaider, J. I. (2015). Personalized respiratory medicine: exploring the horizon, addressing the issues. Summary of a BRN-AJRCCM workshop held in Barcelona on June 12, 2014. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 191(4), 391–401.
- Anderson, G. P. (2008). Endotyping asthma: new insights into key pathogenic mechanisms in a complex, heterogeneous disease. *The Lancet*, 372(9643), 1107–1119.
- Anderson, H. R., Gupta, R., & Strachan, D. P. (2007). 50 years of asthma: UK trends from 1955 to 2004. *Thorax*, 62(1), 85–90.
- Annunziato, F., Romagnani, C., & Romagnani, S. (2015). The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135(3), 626–635.

- Asher, M. I., Montefort, S., Björkstén, B., Lai, C. K. W., Strachan, D. P., Weiland, S. K., & Williams, H. (2006). Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *The Lancet*, 368(9537), 733–743.
- Bel, E. H., Wenzel, S. E., Thompson, P. J., Prazma, C. M., Keene, O. N., Yancey, S. W., Ortega, H. G., & Pavord, I. D. (2014). Oral glucocorticoid-sparing effect of mepolizumab in eosinophilic asthma. *The New England Journal of Medicine*, 371(13), 1189–1197.
- Berair, R., & Brightling, C. E. (2014). Asthma Therapy and Its Effect on Airway Remodelling. *Drugs*, 74(12), 1345–1369.
- Berry, A., & Busse, W. W. (2016). Biomarkers in asthmatic patients: Has their time come to direct treatment? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(5), 1317–1324.
- Bjermer, L., Lemiere, C., Maspero, J., Weiss, S., Zangrilli, J., & Germinaro, M. (2016). Reslizumab for Inadequately Controlled Asthma With Elevated Blood Eosinophil Levels: A Randomized Phase 3 Study. *Chest*, 150(4), 789–798.
- Bleecker, E. R., FitzGerald, J. M., Chanez, P., Papi, A., Weinstein, S. F., Barker, P., Sproule, S., Gilmartin, G., Aurivillius, M., Werkström, V., & Goldman, M. (2016). Efficacy and safety of benralizumab for patients with severe asthma uncontrolled with high-dosage inhaled corticosteroids and long-acting β_2 -agonists (SIROCCO): a randomised, multicentre, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet*, 388(10056), 2115–2127.
- Braun-Fahrlander, C., Gassner, M., Grize, L., Neu, U., Sennhauser, F. H., Varonier, H. S., Vuille, J. C., Wüthrich, B., & The Scaprol Team. (1999). Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. *Clinical & Experimental Allergy*, 29(1), 28–34.

- Brightling, C., Berry, M., & Amrani, Y. (2008). Targeting TNF- α : A novel therapeutic approach for asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(1), 5–12.
- Brightling, C. E., Chanez, P., Leigh, R., O'Byrne, P. M., Korn, S., She, D., May, R. D., Streicher, K., Ranade, K., & Piper, E. (2015). Efficacy and safety of tralokinumab in patients with severe uncontrolled asthma: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *The Lancet Respiratory Medicine*, 3(9), 692–701.
- Brusselle, G. G., Maes, T., & Bracke, K. R. (2013). Eosinophils in the Spotlight: Eosinophilic airway inflammation in nonallergic asthma. *Nat Med*, 19(8), 977–979.
- Bundesärztekammer, (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung, (KBV), & Fachgesellschaften Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen, (AWMF). (2009). *Nationale VersorgungsLeitlinie Asthma - Langfassung, 2. Auflage. Version 5. 2009, zuletzt geändert: August 2013. Dtsch Arztebl U15 - 006594* (Vol. 102).
- Busse, W. W., Morgan, W. J., Gergen, P. J., Mitchell, H. E., Gern, J. E., Liu, A. H., Gruchalla, R. S., Kattan, M., Teach, S. J., Pongracic, J. A., Chmiel, J. F., Steinbach, S. F., Calatroni, A., Togias, A., Thompson, K. M., Szeffler, S. J., & Sorkness, C. A. (2011). Randomized Trial of Omalizumab (Anti-IgE) for Asthma in Inner-City Children. *New England Journal of Medicine*, 364(11), 1005–1015.
- Caramori, G., Lim, S., Ito, K., Tomita, K., Oates, T., Jazrawi, E., Chung, K. F., Barnes, P. J., & Adcock, I. M. (2001). Expression of GATA family of transcription factors in T-cells, monocytes and bronchial biopsies. *European Respiratory Journal*, 18(3), 466–473. Retrieved from
- Castro, M., Zangrilli, J., Wechsler, M. E., Bateman, E. D., Brusselle, G. G., Bardin, P., Murphy, K., Maspero, J. F., O'Brien, C., & Korn, S. (2015). Reslizumab for inadequately controlled asthma with elevated blood eosinophil counts: results from two multicentre, parallel, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trials. *The Lancet. Respiratory Medicine*, 3(5), 355–366.

- Chapoval, A. I., Ni, J., Lau, J. S., Wilcox, R. A., Flies, D. B., Liu, D., Dong, H., Sica, G. L., Zhu, G., Tamada, K., & Chen, L. (2001). B7-H3: A costimulatory molecule for T cell activation and IFN-[gamma] production. *Nat Immunol*, 2(3), 269–274.
- Chaudhuri, R., Norris, V., Kelly, K., Zhu, C.-Q., Ambery, C., Lafferty, J., Cameron, E., & Thomson, N. C. (2014). Effects of a FLAP inhibitor, GSK2190915, in asthmatics with high sputum neutrophils. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 27(1), 62–69.
- Chung, K. F., Wenzel, S. E., Brozek, J. L., Bush, A., Castro, M., Sterk, P. J., Adcock, I. M., Bateman, E. D., Bel, E. H., Bleecker, E. R., Boulet, L.-P., Brightling, C., Chanez, P., Dahlen, S.-E., Djukanovic, R., Frey, U., Gaga, M., Gibson, P., Hamid, Q., Jajour, N. N., Mauad, T., Sorkness, R. L., & Teague, W. G. (2014). International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *European Respiratory Journal*, 43(2), 343 LP-373.
- Ciprandi, G., Tosca, M. A., Silvestri, M., & Ricciardolo, F. L. M. (2017). Inflammatory biomarkers for asthma endotyping and consequent personalized therapy. *Expert Review of Clinical Immunology*, 13(7), 715–721.
- Cohen, S., & Milstein, C. (1967). Structure of Antibody Molecules. *Nature*, 214(5087), 449–541.
- Corren, J., Weinstein, S., Janka, L., Zangrilli, J., & Garin, M. (2016). Phase 3 Study of Reslizumab in Patients With Poorly Controlled Asthma: Effects Across a Broad Range of Eosinophil Counts. *Chest*, 150(4), 799–810.
- da Silva, A. L., Magalhães, R. F., Branco, V. C., Silva, J. D., Cruz, F. F., Marques, P. S., Ferreira, T. P. T., Morales, M. M., Martins, M. A., Olsen, P. C., & Rocco, P. R. M. (2016). The tyrosine kinase inhibitor dasatinib reduces lung inflammation and remodelling in experimental allergic asthma. *British Journal of Pharmacology*, 173(7), 1236–1247.
- Desai, M., & Oppenheimer, J. (2016). Elucidating asthma phenotypes and endotypes: progress towards personalized medicine. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 116(5), 394–401.

- Douwes, J., Gibson, P., Pekkanen, J., & Pearce, N. (2002). Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax*, 57(7), 643–648.
- El-Zein, M., Parent, M. E., Benedetti, A., & Rousseau, M. C. (2010). Does BCG vaccination protect against the development of childhood asthma? A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *International Journal of Epidemiology*, 39(2), 469–486.
- Eltboli, O., & Brightling, C. E. (2013). Eosinophils as diagnostic tools in chronic lung disease. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 7(1), 33–42.
- Fang, T. C., Yashiro-Ohtani, Y., Del Bianco, C., Knoblock, D. M., Blacklow, S. C., & Pear, W. S. (2007). Notch Directly Regulates Gata3 Expression during T Helper 2 Cell Differentiation. *Immunity*, 27(1), 100–110.
- Finotto, S., Neurath, M. F., Glickman, J. N., Qin, S., Lehr, H. A., Green, F. H. Y., Ackerman, K., Haley, K., Galle, P. R., Szabo, S. J., Drazen, J. M., De Sanctis, G. T., & Glimcher, L. H. (2002). Development of Spontaneous Airway Changes Consistent with Human Asthma in Mice Lacking T-bet. *Science*, 295(5553), 336–338.
- Frank, R., & Hargreaves, R. (2003). Clinical biomarkers in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*, 2(7), 566–580.
- Garn, H., & Renz, H. (2007). Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis. *Immunobiology*, 212(6), 441–452.
- Gesundheitsberichterstattung des Bundes, (GBE). (2018). Krankheitskosten in Mio. € für Deutschland. Gliederungsmerkmale: Jahre, Alter, Geschlecht, ICD10. Retrieved February 22, 2018, from <http://www.gbe-bund.de>
- Global Initiative for Asthma (GINA). (2017). *Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, 2017*.
- Green, R., Brightling, C., Woltmann, G., Parker, D., Wardlaw, A., & Pavord, I. (2002). Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids. *Thorax*, 57(10), 875–879.

- Green, R. H., Brightling, C. E., McKenna, S., Hargadon, B., Parker, D., Bradding, P., Wardlaw, A. J., & Pavord, I. D. (2002). Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*, 360(9347), 1715–1721.
- Grogan, J. L., & Locksley, R. M. (2002). T helper cell differentiation: on again, off again. *Current Opinion in Immunology*, 14(3), 366–372.
- Guntur, V. P., & Reiner, C. R. (2012). The potential use of tyrosine kinase inhibitors in severe asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 12(1), 68–75.
- Hallstrand, T. S., Moody, M. W., Wurfel, M. M., Schwartz, L. B., Henderson, W. R., & Aitken, M. L. (2005). Inflammatory Basis of Exercise-induced Bronchoconstriction. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 172(6), 679–686.
- Hanania, N. A., Alpan, O., Hamilos, D. L., Condemi, J. J., Reyes-Rivera, I., Zhu, J., Rosen, K. E., Eisner, M. D., Wong, D. A., & Busse, W. (2011). Omalizumab in severe allergic asthma inadequately controlled with standard therapy: a randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, 154(9), 573–582.
- Hanania, N. A., Korenblat, P., Chapman, K. R., Bateman, E. D., Kopecky, P., Paggiaro, P., Yokoyama, A., Olsson, J., Gray, S., Holweg, C. T. J., Eisner, M., Asare, C., Fischer, S. K., Peng, K., Putnam, W. S., & Matthews, J. G. (2016). Efficacy and safety of lebrikizumab in patients with uncontrolled asthma (LAVOLTA I and LAVOLTA II): replicate, phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trials. *The Lancet. Respiratory Medicine*, 4(10), 781–796.
- Hanania, N. A., Wenzel, S., Rosen, K., Hsieh, H.-J., Mosesova, S., Choy, D. F., Lal, P., Arron, J. R., Harris, J. M., & Busse, W. (2013). Exploring the effects of omalizumab in allergic asthma: an analysis of biomarkers in the EXTRA study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 187(8), 804–811.

- Heinrich, J., Hoelscher, B., Frye, C., Meyer, I., Wjst, M., & Wichmann, H.-E. (2002). Trends in prevalence of atopic diseases and allergic sensitization in children in Eastern Germany. *European Respiratory Journal*, 19(6), 1040 LP-1046.
- Holgate, S. T. (2007). The epithelium takes centre stage in asthma and atopic dermatitis. *Trends in Immunology*, 28(6), 248–251.
- Holgate, S. T., & Polosa, R. (2008). Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol*, 8(3), 218–230.
- Homburg, U., Renz, H., Timmer, W., Hohlfeld, J. M., Seitz, F., Lüer, K., Mayer, A., Wacker, A., Schmidt, O., Kuhlmann, J., Turowska, A., Roller, J., Kutz, K., Schlüter, G., Krug, N., & Garn, H. (2015). Safety and tolerability of a novel inhaled GATA3 mRNA targeting DNAzyme in patients with TH2-driven asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(3), 797–800.
- Hwang, E. S., Szabo, S. J., Schwartzberg, P. L., & Glimcher, L. H. (2005). T Helper Cell Fate Specified by Kinase-Mediated Interaction of T-bet with GATA-3. *Science*, 307(5708), 430–433.
- Jackson, D. J., Gangnon, R. E., Evans, M. D., Roberg, K. A., Anderson, E. L., Pappas, T. E., Printz, M. C., Lee, W.-M., Shult, P. A., Reisdorf, E., Carlson-Dakes, K. T., Salazar, L. P., DaSilva, D. F., Tisler, C. J., Gern, J. E., & Lemanske, R. F. (2008). Wheezing Rhinovirus Illnesses in Early Life Predict Asthma Development in High-Risk Children. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 178(7), 667–672.
- Jacobsen, E. A., Taranova, A. G., Lee, N. A., & Lee, J. J. (2007). Eosinophils: Singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 119(6), 1313–1320.
- Jacobson, N. G., Szabo, S. J., Weber-Nordt, R. M., Zhong, Z., Schreiber, R. D., Darnell Jr., J. E., & Murphy, K. M. (1995). Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *The Journal of Experimental Medicine*, 181(5), 1755–1762.

- Jameson, J. L., & Longo, D. L. (2015). Precision Medicine — Personalized, Problematic, and Promising. *New England Journal of Medicine*, 372(23), 2229–2234.
- Kallies, A., & Good-Jacobson, K. L. (2017). Transcription Factor T-bet Orchestrates Lineage Development and Function in the Immune System. *Trends in Immunology*, 38(4), 287–297.
- Krug, N., Hohlfeld, J. M., Kirsten, A.-M., Kornmann, O., Beeh, K. M., Kappeler, D., Korn, S., Ignatenko, S., Timmer, W., Rogon, C., Zeitvogel, J., Zhang, N., Bille, J., Homburg, U., Turowska, A., Bachert, C., Werfel, T., Buhl, R., Renz, J., Garn, H., & Renz, H. (2015). Allergen-Induced Asthmatic Responses Modified by a GATA3-Specific DNAzyme. *New England Journal of Medicine*, 372(21), 1987–1995.
- Kuo, C.-H. S., Pavlidis, S., Loza, M., Baribaud, F., Rowe, A., Pandis, I., Sousa, A., Corfield, J., Djukanovic, R., Lutter, R., Sterk, P. J., Auffray, C., Guo, Y., Adcock, I. M., & Chung, K. F. (2017). T-helper cell type 2 (Th2) and non-Th2 molecular phenotypes of asthma using sputum transcriptomics in U-BIOPRED. *The European Respiratory Journal*, 49(2).
- Kuo, M.-L., Huang, J.-L., Yeh, K.-W., Li, P.-S., & Hsieh, K.-H. (2001). Evaluation of Th1/Th2 ratio and cytokine production profile during acute exacerbation and convalescence in asthmatic children. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 86(3), 272–276.
- Kurata, H., Lee, H. J., O'Garra, A., & Arai, N. (1999). Ectopic Expression of Activated Stat6 Induces the Expression of Th2-Specific Cytokines and Transcription Factors in Developing Th1 Cells. *Immunity*, 11(6), 677–688.
- Lapraz, J.-C., Hedayat, K. M., & Pauly, P. (2013). Endobiogeny: A Global Approach to Systems Biology (Part 2 of 2). *Global Advances in Health and Medicine*, 2(2), 32–44.
- Lazarevic, V., Glimcher, L. H., & Lord, G. M. (2013). T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 13(11), 777–789.

- Licari, A., Castagnoli, R., Brambilla, I., Marseglia, A., Tosca, M. A., Marseglia, G. L., & Ciprandi, G. (2017). New approaches for identifying and testing potential new anti-asthma agents. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 13(1), 51–63.
- Linneberg, A., Østergaard, C., Tvede, M., Andersen, L. P., Nielsen, N. H., Madsen, F., Frølund, L., Dirksen, A., & Jørgensen, T. (2003). IgG antibodies against microorganisms and atopic disease in Danish adults: The Copenhagen Allergy Study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(4), 847–853.
- Lombardi, V., Singh, A. K., & Akbari, O. (2010). The Role of Costimulatory Molecules in Allergic Disease and Asthma. *International Archives of Allergy and Immunology*, 151(3), 179–189.
- Lötvall, J., Akdis, C. A., Bacharier, L. B., Bjermer, L., Casale, T. B., Custovic, A., Lemanske Jr., R. F., Wardlaw, A. J., Wenzel, S. E., & Greenberger, P. A. (2011). Asthma endotypes: A new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(2), 355–360.
- Malinovschi, A., Fonseca, J. A., Jacinto, T., Alving, K., & Janson, C. (2013). Exhaled nitric oxide levels and blood eosinophil counts independently associate with wheeze and asthma events in National Health and Nutrition Examination Survey subjects. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132(4), 821–827.e5.
- Mallol, J., Crane, J., von Mutius, E., Odhiambo, J., Keil, U., Stewart, A., & ISAAC Phase Three Study Group. (2013). The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Phase Three: A global synthesis. *Allergologia et Immunopathologia*, 41(2), 73–85.
- Maneechotesuwan, K., Xin, Y., Ito, K., Jazrawi, E., Lee, K.-Y., Usmani, O. S., Barnes, P. J., & Adcock, I. M. (2007). Regulation of Th2 Cytokine Genes by p38 MAPK-Mediated Phosphorylation of GATA-3. *The Journal of Immunology*, 178(4), 2491 LP-2498.

- McGrath, K. W., Icitovic, N., Boushey, H. A., Lazarus, S. C., Sutherland, E. R., Chinchilli, V. M., Fahy, J. V, & for the Asthma Clinical Research Network of the National Heart and Blood Institute, L. (2012). A Large Subgroup of Mild-to-Moderate Asthma Is Persistently Noneosinophilic. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 185(6), 612–619.
- McKinley, L., Alcorn, J. F., Peterson, A., Dupont, R. B., Kapadia, S., Logar, A., Henry, A., Irvin, C. G., Piganelli, J. D., Ray, A., & Kolls, J. K. (2008). TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(6), 4089–4097.
- Medoff, B. D., Thomas, S. Y., & Luster, A. D. (2008). T Cell Trafficking in Allergic Asthma: The Ins and Outs. *Annual Review of Immunology*, 26(1), 205–232.
- Minty, A., Chalon, P., Derocq, J.-M., Dumont, X., Guillemot, J.-C., Kaghad, M., Labit, C., Leplatois, P., Liauzun, P., Miloux, B., Minty, C., Casellas, P., Loison, G., Lupker, J., Shire, D., Ferrara, P., & Caput, D. (1993). Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*, 362(6417), 248–250.
- Moore, W. C., Hastie, A. T., Li, X., Li, H., Busse, W. W., Jarjour, N. N., Wenzel, S. E., Peters, S. P., Meyers, D. A., & Bleecker, E. R. (2014). Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 133(6), 1557–63.e5.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., & Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone . I . Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins . *The Journal of Immunology*, 136(7), 2348–2357.
- Muehling, L. M., Lawrence, M. G., & Woodfolk, J. A. (2017). Pathogenic CD4+ T cells in patients with asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*.

- Nair, P., Gaga, M., Zervas, E., Alagha, K., Hargreave, F. E., O'Byrne, P. M., Stryszak, P., Gann, L., Sadeh, J., & Chanez, P. (2012). Safety and efficacy of a CXCR2 antagonist in patients with severe asthma and sputum neutrophils: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 42(7), 1097–1103.
- Nair, P., Wenzel, S., Rabe, K. F., Bourdin, A., Lugogo, N. L., Kuna, P., Barker, P., Sproule, S., Ponnarambil, S., & Goldman, M. (2017). Oral Glucocorticoid-Sparing Effect of Benralizumab in Severe Asthma. *New England Journal of Medicine*, 376(25), 2448–2458.
- Nakamura, Y., Ghaffar, O., Olivenstein, R., Taha, R. A., Soussi-Gounni, A., Zhang, D.-H., Ray, A., & Hamid, Q. (1999). Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103(2), 215–222.
- Nakamura, Y., & Hoshino, M. (2005). TH2 Cytokines and Associated Transcription Factors as Therapeutic Targets in Asthma. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy*.
- NCBI. (2017a). GATA-3 [Homo sapiens]. Retrieved October 11, 2017, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAA38877.1>
- NCBI. (2017b). T-box transcription factor TBX21 [Homo sapiens]. Retrieved October 13, 2017, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_037483.1
- NCBI. (2018). Actin. Retrieved February 20, 2018, from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001092.1
- Nicolai, T., Bellach, B., Mutius, E. V., Thefeld, W., & Hoffmeister, H. (1997). Increased prevalence of sensitization against aeroallergens in adults in West compared with East Germany. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 27(8), 886–892.
- Nicolai, T., & Mutius, E. v. (1996). Respiratory hypersensitivity and environmental factors: East and West Germany. *Toxicology Letters*, 86(2), 105–113.

- Normansell, R., Walker, S., Milan, S. J., Walters, E. H., & Nair, P. (2014). Omalizumab for asthma in adults and children. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (1), CD003559.
- O'Byrne, P. M., Metev, H., Puu, M., Richter, K., Keen, C., Uddin, M., Larsson, B., Cullberg, M., & Nair, P. (2016). Efficacy and safety of a CXCR2 antagonist, AZD5069, in patients with uncontrolled persistent asthma: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet. Respiratory Medicine*, 4(10), 797–806.
- O'Garra, A., & Arai, N. (2000). The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends in Cell Biology*, 10(12), 542–550.
- O'Garra, A., & Gabryšová, L. (2016). Transcription Factors Directing Th2 Differentiation: Gata-3 Plays a Dominant Role. *The Journal of Immunology*, 196(11), 4423 LP-4425.
- Ortega, H. G., Liu, M. C., Pavord, I. D., Brusselle, G. G., FitzGerald, J. M., Chetta, A., Humbert, M., Katz, L. E., Keene, O. N., Yancey, S. W., & Chanez, P. (2014). Mepolizumab treatment in patients with severe eosinophilic asthma. *The New England Journal of Medicine*, 371(13), 1198–1207.
- Ortega, H. G., Yancey, S. W., Mayer, B., Gunsoy, N. B., Keene, O. N., Bleecker, E. R., Brightling, C. E., & Pavord, I. D. (2016). Severe eosinophilic asthma treated with mepolizumab stratified by baseline eosinophil thresholds: a secondary analysis of the DREAM and MENSA studies. *The Lancet. Respiratory Medicine*, 4(7), 549–556.
- Özkaynak, E., Gao, W., Shemmeri, N., Wang, C., Gutierrez-Ramos, J.-C., Amaral, J., Qin, S., Rottman, J. B., Coyle, A. J., & Hancock, W. W. (2001). Importance of ICOS-B7RP-1 costimulation in acute and chronic allograft rejection. *Nat Immunol*, 2(7), 591–596.
- Pai, S.-Y., Truitt, M. L., & Ho, I.-C. (2004). GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(7), 1993–1998.

- Papi, A., Brightling, C., Pedersen, S. E., & Reddel, H. K. (2017). Asthma. *The Lancet*.
- Pizzichini, E., Pizzichini, M. M., Efthimiadis, A., Dolovich, J., & Hargreave, F. E. (1997). Measuring airway inflammation in asthma: Eosinophils and eosinophilic cationic protein in induced sputum compared with peripheral blood. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 99(4), 539–544.
- Potaczek, D. P., Garn, H., Unger, S. D., & Renz, H. (2016). Antisense molecules: A new class of drugs. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(5), 1334–1346.
- Quirce, S., Phillips-Angles, E., Domínguez-Ortega, J., & Barranco, P. (2017). Biologics in the treatment of severe asthma. *Allergologia et Immunopathologia*, 45, 45–49.
- Rackemann, F. M. (1918). A clinical study of one hundred and fifty cases of bronchial asthma. *Archives of Internal Medicine*, XXII(4), 517–552.
- Rackemann, F. M. (1947). A working classification of asthma. *The American Journal of Medicine*, 3(5), 601–606.
- Raundhal, M., Morse, C., Khare, A., Oriss, T. B., Milosevic, J., Trudeau, J., Huff, R., Pilewski, J., Holguin, F., Kolls, J., Wenzel, S., Ray, P., & Ray, A. (2015). High IFN- γ and low SLPI mark severe asthma in mice and humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(8), 3037–3050.
- Ricciardolo, F. L. M., Sorbello, V., Conticello, S., & Ciprandi, G. (2015). Th17 polarization and upper airways: new insights. *Clinical & Experimental Allergy*, 45(12), 1873–1874.
- Riedler, J., Braun-Fahrlander, C., Eder, W., Schreuer, M., Waser, M., Maisch, S., Carr, D., Schierl, R., Nowak, D., & von Mutius, E. (2001). Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *The Lancet*, 358(9288), 1129–1133.
- Ring, J., Bachert, C., Bauer, C.-P., & Wolfgang, C. (2010). *Weißbuch Allergie in Deutschland* (3rd ed.). Urban und Vogel.

- Robert Koch Institut (Hrsg). (2015). Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Gemeinsam getragen von RKI und Destatis. RKI, Berlin.
- Robinson, D. S., Hamid, Q., Ying, S., Tsicopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A. M., Corrigan, C., Durham, S. R., & Kay, A. B. (1992). Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *The New England Journal of Medicine*, 326(5), 298–304.
- Romagnani, S. (1994). Lymphokine Production by Human T Cells in Disease States. *Annual Review of Immunology*, 12(1), 227–257.
- Rottman, J. B., Smith, T., Tonra, J. R., Ganley, K., Bloom, T., Silva, R., Pierce, B., Gutierrez-Ramos, J.-C., Ozkaynak, E., & Coyle, A. J. (2001). The costimulatory molecule ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE. *Nat Immunol*, 2(7), 605–611.
- Russell, R. J., & Brightling, C. (2017). Pathogenesis of asthma: implications for precision medicine. *Clinical Science*, 131(14), 1723–1735.
- Sallusto, F. (2016). Heterogeneity of Human CD4⁺ T Cells Against Microbes. *Annual Review of Immunology*, 34(1), 317–334.
- Samitas, K., Zervas, E., & Gaga, M. (2017). T2-low asthma: current approach to diagnosis and therapy. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 23(1), 48–55.
- Santini, G., Mores, N., Malerba, M., Mondino, C., Anzivino, R., Macis, G., & Montuschi, P. (2017). Dupilumab for the treatment of asthma. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 26(3), 357–366.
- Scheinman, E. J., & Avni, O. (2009). Transcriptional Regulation of Gata3 in T Helper Cells by the Integrated Activities of Transcription Factors Downstream of the Interleukin-4 Receptor and T Cell Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 284(5), 3037–3048.
- Schleich, F., Demarche, S., & Louis, R. (2016). Biomarkers in the Management of Difficult Asthma. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(14), 1561–1573.

- Schleich, F. N., Manise, M., Sele, J., Henket, M., Seidel, L., & Louis, R. (2013). Distribution of sputum cellular phenotype in a large asthma cohort: predicting factors for eosinophilic vs neutrophilic inflammation. *BMC Pulmonary Medicine*, 13, 11.
- Sel, S., Wegmann, M., Dicke, T., Sel, S., Henke, W., Yildirim, A. Ö., Renz, H., & Garn, H. (2008). Effective prevention and therapy of experimental allergic asthma using a GATA-3-specific DNase. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(4), 910–916.e5.
- Sher, A., Coffman, R. L., Hieny, S., & Cheever, A. W. (1990). Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. *The Journal of Immunology*, 145, 3911–3916.
- Simpson, J. L., Grissell, T. V, Douwes, J., Scott, R. J., Boyle, M. J., & Gibson, P. G. (2007). Innate immune activation in neutrophilic asthma and bronchiectasis. *Thorax*, 62(3), 211–218.
- Simpson, J. L., Scott, R., Boyle, M. J., & Gibson, P. G. (2006). Inflammatory subtypes in asthma: Assessment and identification using induced sputum. *Respirology*, 11(1), 54–61.
- Spellberg, B., & Edwards John E., J. (2001). Type 1/Type 2 Immunity in Infectious Diseases. *Clinical Infectious Diseases*, 32(1), 76–102.
- Strachan, D. P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ: British Medical Journal*, 299(6710), 1259–1260.
- Sutcliffe, A., Hollins, F., Gomez, E., Saunders, R., Doe, C., Cooke, M., Challiss, R. A. J., & Brightling, C. E. (2012). Increased Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase 4 Expression Mediates Intrinsic Airway Smooth Muscle Hypercontractility in Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 185(3), 267–274.
- Swain, S. L., Weinberg, A. D., English, M., & Huston, G. (1990). IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 145(11), 3796–3806.

- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., & Glimcher, L. H. (2000). A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell*, 100(6), 655–669.
- Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Peng, S. L., & Glimcher, L. H. (2003). Molecular Mechanisms Regulating Th1 Immune Responses. *Annual Review of Immunology*, 21(1), 713–758.
- Szefer, S. J., Wenzel, S., Brown, R., Erzurum, S. C., Fahy, J. V., Hamilton, R. G., Hunt, J. F., Kita, H., Liu, A. H., Panettieri, R. A., Schleimer, R. P., & Minnicozzi, M. (2012). Asthma outcomes: Biomarkers. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(3 Suppl), S9-23.
- Tajiri, T., Matsumoto, H., Gon, Y., Ito, R., Hashimoto, S., Izuhara, K., Suzukawa, M., Ohta, K., Ono, J., Ohta, S., Ito, I., Oguma, T., Inoue, H., Iwata, T., Kanemitsu, Y., Nagasaki, T., Niimi, A., & Mishima, M. (2016). Utility of serum periostin and free IgE levels in evaluating responsiveness to omalizumab in patients with severe asthma. *Allergy*, 71(10), 1472–1479.
- Tatum, A. J., & Shapiro, G. G. (2005). The effects of outdoor air pollution and tobacco smoke on asthma. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 25(1), 15–30.
- Teach, S. J., Gill, M. A., Togias, A., Sorkness, C. A., Arbes, S. J. J., Calatroni, A., Wildfire, J. J., Gergen, P. J., Cohen, R. T., Pongracic, J. A., Kerckmar, C. M., Khurana Hershey, G. K., Gruchalla, R. S., Liu, A. H., Zoratti, E. M., Kattan, M., Grindle, K. A., Gern, J. E., Busse, W. W., & Szefer, S. J. (2015). Preseasonal treatment with either omalizumab or an inhaled corticosteroid boost to prevent fall asthma exacerbations. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(6), 1476–1485.
- Thomson, N. C. (2016). Novel approaches to the management of noneosinophilic asthma. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, 10(3), 211–234.
- Thomson, N. C. (2017). New and developing non-adrenoreceptor small molecule drugs for the treatment of asthma. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 18(3), 283–293.

- Truyen, E., Coteur, L., Dilissen, E., Overbergh, L., Dupont, L. J., Ceuppens, J. L., & Bullens, D. M. A. (2006). Evaluation of airway inflammation by quantitative Th1/Th2 cytokine mRNA measurement in sputum of asthma patients. *Thorax*, 61(3), 202–208.
- Von Mutius, E. (2010). Prävalenz und Determinanten des Asthma bronchiale. *Monatsschrift Fur Kinderheilkunde*, 158(2), 121–128.
- Wadsworth, S. J., & Sandford, A. J. (2013). Personalised Medicine and Asthma Diagnostics/Management. *Current Allergy and Asthma Reports*, 13(1), 118–129.
- Wagener, A. H., de Nijs, S. B., Lutter, R., Sousa, A. R., Weersink, E. J. M., Bel, E. H., & Sterk, P. J. (2015). External validation of blood eosinophils, FENO and serum periostin as surrogates for sputum eosinophils in asthma. *Thorax*, 70(2), 115–120.
- Walker, C., Virchow, J. C., Bruijnzeel, P. L., & Blaser, K. (1991). T cell subsets and their soluble products regulate eosinophilia in allergic and nonallergic asthma. *The Journal of Immunology*, 146(6), 1829 LP-1835.
- Wang, C., Collins, M., & Kuchroo, V. K. (2015). Effector T cell differentiation: are master regulators of effector T cells still the masters? *Current Opinion in Immunology*, 37(Supplement C), 6–10.
- Wang, Y., Misumi, I., Gu, A.-D., Curtis, T. A., Su, L., Whitmire, J. K., & Wan, Y. Y. (2013). GATA-3 controls the maintenance and proliferation of T cells downstream of TCR and cytokine signaling. *Nat Immunol*, 14(7), 714–722.
- Wardlaw, A. J., Brightling, C., Green, R., Woltmann, G., & Pavord, I. (2000). Eosinophils in asthma and other allergic diseases. *British Medical Bulletin*, 56(4), 985–1003.
- Wäsche, A., & Schreiber, J. (2016). Asthma bronchiale - Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie. Pathophysiology, diagnosis and treatment of asthma: focusing on a chronic disease. *Anästhesiologie Intensivmedizin Notfallmedizin Schmerztherapie*, 51(6), 392–399.
- Weinberger, M. (2003). Treatment strategies for viral respiratory infection-induced asthma. *The Journal of Pediatrics*, 142(2), S34–S39.

- Wenzel, S., Castro, M., Corren, J., Maspero, J., Wang, L., Zhang, B., Pirozzi, G., Sutherland, E. R., Evans, R. R., Joish, V. N., Eckert, L., Graham, N. M. H., Stahl, N., Yancopoulos, G. D., Louis-Tisserand, M., & Teper, A. (2016). Dupilumab efficacy and safety in adults with uncontrolled persistent asthma despite use of medium-to-high-dose inhaled corticosteroids plus a long-acting beta2 agonist: a randomised double-blind placebo-controlled pivotal phase 2b dose-ranging trial. *Lancet (London, England)*, 388(10039), 31–44.
- Wenzel, S. E. (2006). Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *The Lancet*, 368(9537), 804–813.
- Wenzel, S. E., Schwartz, L. B., Langmack, E. L., Halliday, J. L., Trudeau, J. B., Gibbs, R. L., & Chu, H. W. (1999). Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 160(3), 1001–1008.
- Wilson, V., & Conlon, F. L. (2002). The T-box family. *Genome Biology*, 3(6), reviews3008.1.
- Wisniewski, J. A., Muehling, L. M., Eccles, J. D., Capaldo, B. J., Agrawal, R., Shirley, D.-A., Patrie, J. T., Workman, L. J., Schuyler, A. J., Lawrence, M. G., Teague, W. G., & Woodfolk, J. A. (2017). Th1 Signatures Are Present in the Lower Airways of Children with Severe Asthma, Regardless of Allergic Status. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*.
- Woodruff, P. G., Boushey, H. A., Dolganov, G. M., Barker, C. S., Yang, Y. H., Donnelly, S., Ellwanger, A., Sidhu, S. S., Dao-Pick, T. P., Pantoja, C., Erle, D. J., Yamamoto, K. R., & Fahy, J. V. (2007). Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(40), 15858–15863.
- World Health Organization (WHO). (2007). *Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases: a comprehensive approach. Chronic respiratory disease*.

- Yamashita, M., Ukai-Tadenuma, M., Miyamoto, T., Sugaya, K., Hosokawa, H., Hasegawa, A., Kimura, M., Taniguchi, M., DeGregori, J., & Nakayama, T. (2004). Essential Role of GATA3 for the Maintenance of Type 2 Helper T (Th2) Cytokine Production and Chromatin Remodeling at the Th2 Cytokine Gene Loci. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 26983–26990.
- Ye, P., Rodriguez, F. H., Kanaly, S., Stocking, K. L., Schurr, J., Schwarzenberger, P., Oliver, P., Huang, W., Zhang, P., Zhang, J., Shellito, J. E., Bagby, G. J., Nelson, S., Charrier, K., Peschon, J. J., & Kolls, J. K. (2001). Requirement of Interleukin 17 Receptor Signaling for Lung Cxc Chemokine and Granulocyte Colony-Stimulating Factor Expression, Neutrophil Recruitment, and Host Defense. *The Journal of Experimental Medicine*, 194(4), 519–528.
- Yoshimoto, T., Yoshimoto, T., Yasuda, K., Mizuguchi, J., & Nakanishi, K. (2007). IL-27 Suppresses Th2 Cell Development and Th2 Cytokines Production from Polarized Th2 Cells: A Novel Therapeutic Way for Th2-Mediated Allergic Inflammation. *The Journal of Immunology*, 179(7), 4415–4423.
- Zheng, W., & Flavell, R. A. (1997). The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells. *Cell*, 89(4), 587–596.
- Zhu, J., Yamane, H., Cote-Sierra, J., Guo, L., & Paul, W. E. (2006). GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res*, 16(1), 3–10.
- Zissler, U. M., Esser-von Bieren, J., Jakwerth, C. A., Chaker, A. M., & Schmidt-Weber, C. B. (2016). Current and future biomarkers in allergic asthma. *Allergy*, 71(4), 475–494.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Deutsch / <i>Englisch</i>
α	anti
Abb.	Abbildung
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
APC	Antigenpräsentierende Zellen / <i>Antigen presenting cells</i>
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
biot	biotinyliert / <i>biotinoylated</i>
°C	Grad Celsius
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4</i>
CXCR2	<i>C-X-C motif chemokine receptor 2</i>
D	Esel / <i>donkey</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure / <i>desoxyribonucleic acid</i>
DOC	Natriumdesoxycholat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FeNO	Stickstoffmonoxid-Fraktion in der Ausatemluft / <i>Fraction of exhaled nitric oxide</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FLAP	<i>5-lipoxygenase-activating protein</i>
G	Ziege / <i>goat</i>
g	Gramm
GATA-3	<i>GATA binding protein 3</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
H	Mensch / <i>human</i>
HBE	Humane Bronchialepithelzellen / <i>Human bronchial epithelial cells</i>
HCl	Salzsäure
HIS	polyHistidin / <i>polyHistidine</i>
HIS-Tag	PolyHistidin-Markierung / <i>polyHistidine-Tag</i>
HRP	Meerrettichperoxidase / <i>Horseradish peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

Abkürzungsverzeichnis

κ	Immunglobulin leichte Kette κ
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
l	Liter
M	Maus / <i>mouse</i>
m	monoklonal / <i>monoclonal</i>
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierende Proteinkinase / <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex / <i>Major histocompatibility complex</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure / <i>messenger ribonucleic acid</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₂ PO ₄ - 2H ₂ O	di-Natriumhydrogen-phosphat-Dihydrat
NFAT1	<i>Nuclear factor of activated T-cells 1</i>
NF-IL6	<i>Nuclear factor for interleukin-6</i>
ng	Nanogramm
p	polyklonal / <i>polyclonal</i>
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes / <i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung / <i>Phosphate buffered saline</i>
Pre	präabsorbiert / <i>preabsorbed</i>
R	Hase / <i>rabbit</i>
RIPA-Puffer	Radioimmunpräzipitationstest-Puffer / <i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunde/n
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>

Abkürzungsverzeichnis

Str	Streptavidin
Tab.	Tabelle
T-Bet	TBX21 oder T-box 21
TCR	T-Zellrezeptor / <i>T cell receptor</i>
tec	<i>tec protein tyrosine kinase</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
T _h -Zellen	T-Helfer-Zellen
T _h 1-Zellen	T-Helfer-Zellen Typ 1
T _h 2-Zellen	T-Helfer-Zellen Typ 2
T _h 17-Zellen	T-Helfer-Zellen Typ 17
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TPBS	Tween-Phosphatgepufferte Salzlösung / <i>Tween-Phosphate buffered saline</i>
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i>
V	Volt

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Coomassie-Brillant-Blau-Färbung	33
Abb. 2	Nachweis der rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet mit polyklonalen Antikörpern	35
Abb. 3	Nachweis der rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet mit monoklonalen Antikörpern und Pre-pRαM-HRP	37
Abb. 4	Nachweis der rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet mit monoklonalen Antikörpern und Pre-pGαM-κ-HRP	39
Abb. 5	Nachweis der rekombinanten Proteine GATA-3 und T-Bet mit HRP konjugierten monoklonalen Antikörpern	40
Abb. 6	Spezifitätsüberprüfung der monoklonalen Maus-Antikörper durch Test von rekombinantem Protein unterschiedlicher Hersteller	43
Abb. 7	Spezifitätsüberprüfung der monoklonalen Maus-Antikörper durch Test der Kreuzreaktivität	46
Abb. 8	Nachweis von GATA-3 und T-Bet mit dem polyklonalen Antikörper-System in humanem Vollblut	48
Abb. 9	Spike-Experiment für GATA-3	49
Abb. 10	Spike-Experiment für T-Bet	50
Abb. 11	Test von Pre-pRαM-HRP in humanem Vollblut	52
Abb. 12	Nachweis von GATA-3 und T-Bet in humanem Vollblut mit monoklonalen Maus-Antikörpern und Pre-pRαM-HRP	54
Abb. 13	Negativ-Kontrolle von Pre-pRαM-HRP	56
Abb. 14	Nachweis von GATA-3 und T-Bet in humanem Vollblut mit monoklonalen Maus-Antikörpern und Pre-pGαM-κ-HRP	58
Abb. 15	Nachweis von T-Bet in humanem Vollblut mit HRP konjugierten monoklonalen Maus-Antikörpern	59

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Westernblot Geräte	14
Tab. 2	Westernblot Marker	15
Tab. 3	Westernblot Materialien	15
Tab. 4	IT	15
Tab. 5	Chemikalien	16
Tab. 6	Puffer	18
Tab. 7	Verbrauchsmaterialien	20
Tab. 8	Primärantikörper	22
Tab. 9	Sekundärantikörper und Moleküle	23
Tab. 10	Primärantikörper BioGenes	24
Tab. 11	Primärantikörper BioGenes HRP-konjugiert	26
Tab. 12	Rekombinante Proteine	27
Tab. 13	Gesamtprotein der Zelltypen	27
Tab. 14	Trenngel	28
Tab. 15	Sammelgel	28

8 Zusammenfassung

Asthma bronchiale ist eine chronische entzündliche Erkrankung der Atemwege. Das betroffene Patientenkollektiv lässt sich anhand unterschiedlicher Kriterien in verschiedene Phänotypen und Endotypen einteilen. Biomarker sind Grundlage für die Stratifikation der betroffenen Patienten und auch immer mehr Entscheidungsgrundlage für die zunehmende Personalisierung der Therapie.

In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen eines Kooperationsprojektes zwischen dem Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie - Molekulare Diagnostik der Philipps-Universität Marburg und der DRG Instruments GmbH ein primär auf monoklonalen Maus-Antikörpern basierendes Westernblot-Nachweissystem für die humanen Transkriptionsfaktoren GATA-3 und T-Bet in humanem Vollblut entwickelt.

Ein schon innerhalb der Arbeitsgruppe etabliertes Nachweissystem für GATA-3 und T-Bet in Gesamtprotein aus Zelltypen mit polyklonalen Antikörpern wurde in dieser Arbeit erfolgreich auf neue Probenmaterialien übertragen. Mit diesen Antikörpern gelang sowohl der direkte Nachweis der rekombinanten Proteine (GATA-3 und T-Bet) als auch der Nachweis der Transkriptionsfaktoren in humanem Vollblut.

Mit den speziell für dieses Projekt entwickelten monoklonalen Maus-Antikörpern gelang ebenfalls der Nachweis von GATA-3 und T-Bet sowohl für die rekombinanten Proteine als auch native Proteine in humanen Vollblutproben mittels Westernblot-Nachweissystem.

Sowohl mit polyklonalen als auch mit monoklonalen Antikörpern konnten Konzentrationsunterschiede entsprechend der eingesetzten Menge an Probe und auch artifizielle Konzentrationsunterschiede in mit rekombinantem Protein gespicketen Blutproben nachgewiesen werden.

Eine unspezifische Signalamplifikation durch den 2. Antikörper konnte durch die Umstellung auf einen alternativen 2. Antikörper, die Reduktion der verwendeten Probenvolumina und die direkte Konjugation der monoklonalen Maus-Antikörper mit HRP vermieden werden.

Im Rahmen der Sensitivitäts- und Spezifitätsprüfung der monoklonalen Maus-Antikörper zeigten sich Defizite für die α -GATA-3-Antikörper. Rekombinantes

Protein eines anderen Herstellers konnte nicht detektiert werden und es zeigte sich eine Kreuzreaktivität zwischen rekombinantem Protein T-Bet und α -GATA-3-Antikörper. Durch höhere Verdünnung des Antikörpers ließ sich die Kreuzreaktivität vermeiden.

Weiterführende Möglichkeiten zur Testoptimierung bezüglich der verwendeten Materialien und der Probenaufarbeitung werden im Anschluss diskutiert, ebenso wie die Einordnung des Testverfahrens in die aktuelle medizinische Forschung im Kontext der Personalisierung der Diagnostik und Therapie von Asthma bronchiale.

9 Abstract

Bronchial asthma is a chronic inflammatory disease. Based on diverse criteria the affected patient population can be divided into different phenotypes and endotypes. Biomarkers represent an important basis for the stratification of the affected patients and increasingly also for decision making with respect to personalization of the therapy.

The present work was part of a collaboration project between the Institute of Laboratory Medicine and Pathobiochemistry - Molecular Diagnostics of the Philipps-University Marburg and the DRG Instruments GmbH. The aim of this project was the development of a preferentially monoclonal antibody based Westernblot detection system against the human transcription factors GATA-3 und T-Bet in human blood samples.

A detection system for GATA-3 und T-Bet was already established within the working group for the analysis of these factors in total protein fractions from cell lines using polyclonal antibodies. In this work, that system was successfully adapted for the analysis of other sample materials. With these polyclonal antibodies, both the direct detection of recombinant proteins (GATA-3 und T-Bet) and detection of the native transcription factors in human whole blood were achieved.

The monoclonal mouse antibodies developed specifically for this project also enabled the detection of GATA-3 und T-Bet for both, recombinant proteins and native proteins in human blood samples using the Westernblot detection system.

With polyclonal as well as monoclonal antibody systems, concentration differences could be detected according to varying sample amounts and artificially generated concentration differences in blood samples by spiking with recombinant protein.

Nonspecific signal amplification by the second antibody was minimized by switching to an alternative second antibody, reducing the sample volumes used and use of directly HRP-conjugated mouse monoclonal antibodies.

Shortcomings were observed for the α -GATA-3 monoclonal antibodies regarding sensitivity and specificity testing. Recombinant protein from another manufacturer could not be detected by these antibodies. Furthermore, cross-

reactivity was observed for these antibodies with recombinant T-Bet protein, which could be avoided by higher antibody dilution.

In the final discussion section additional options for test optimization with regard to the materials used and sample preparation are discussed. Further, an evaluation of the established test procedure considering current medical research activities in the context of personalization of diagnosis and therapy in patients with bronchial asthma is provided.

10 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg die Damen und Herren Adamkiewicz, Aepinus, Alter, Arabin, Aust, Awe, Baarlink, Bacher, Barth, Bartsch, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Becker, Behe, Bein, Belting, Bender, Benes, Benöhr, Bepler, Berger, Bergmann, Bertelmann, Bertoune, Berwanger, Best, Bette, Beyer, Bien, Bliemel, Blüml, Bock, Bolm, Bonaterra, Bouchard, Bozlurt, Böhm, Bölöni, Bösner, Brandt, Braun, Brehm, Brilla, Brumberg, Bujan, Burchert, Burghard, Bücking, Carl, Cetin, Christ, Conrad, Cordes, Czubayko, Dannowski, Daut, Decher, del Rey, Dettmeyer, Dinges, Dodel, Donner-Banzhoff, Dornow, Duda, Eberhart, Efe, Eggers, Eickmann, Eikmann, Eivazi, Ellenrieder, El Tobgui, El-Zayat, Eming, Engenhardt-Cabillic, Enzensberger, Ermisch, Falkenberg, Faoro, Feldmann, Fendrich, Fenner, Feuser, Franz, Freund, Funck, Frankenberger, Frink, Fritz, Frohme, Fuchs-Winkelmann, Gaiser, Gallmeier, Garn, Gebhardt, Gehling, Geks, Geldner, Geraedts, Gerken, Glatz, Glatzl, Goldmann, Göbel, Göke, Görg, Götze, Graf, Gratz, Gress, Greulich, Grikscheit, Grimm, Grosse, Grundmann, Haberhausen, Habermann, Hadji, Halaszovich, Hasenäcker, Häußermann, Hegele, Heidtmann, Heinis, Hemmeter, Henke, Henzel, Hertl, Heverhagen, Heyd, Heyse, Hildebrandt, Hirdes, Hirsch, Hofer, Hofmann, Holland, Hoss, Hoyer, Höffkes, Hörsch, Hudemann, Hundt, Iqrsusi, Jackisch, Jaques, Jerrentrup, Josephs, Jung, Kaiser, Kalder, Kalinowski, Kamp-Becker, Kann, Kanngießer, Karatolios, Katebini, Kaufmann, Keller, Kern, Kesper, Kerwat, Kill, Kim-Berger, Kinscherf, Kircher, Kirn, Kirschbaum, Klaus, Klose, Kluge, Knake, Knöppel, Koczulla, Kohl, Kolb-Niemann, Kortus, Köhler, König, Kösters, Kratz, Krautheim, Kreutzer, Kroh, Kruse, Kubo, Kuhlmann, Kunsch, Kurt, Kühne, Kühnert, Lankat-Buttgereit, Lauer, Lauth, Leonhardt, Librizzi, Lill, Lindstedt, Loest, Lohoff, Luster, Lübbe, Lübke, Lüsebrink, Mahnken, Maier, Maisch, Maisner, Mand, Manthey, Meissner, Merte, Maurer, Mehl, Menzler, Metzelder, Meyer, Michl, Mingbach, Moll, Moosdorf, Morin, Möller, Mühlenhoff, Müller, Müller-Brüsselbach, Mueller, Mutters, Mylius, Nain, Neff, Neubauer, Neubert, Neumüller, Nikolaizik, Nimphius, Nimsky, Nockher, Noll, Oberthür, Oberwinkler, Oertel, Ohlow, Olbert, Oliver, Opitz, Öhler, Pagenstecher, Pankow, Pankuweit, Pantazis, Patrascan, Pape-Meyer, Parahuleva, Pehl, Peterlein, Pfefferle, Pfeiffer, Pfützner, Pinkenburg, Plant, Plöger, Politi, Preisig-Müller, Pressel, Printz, Puccetti, Quascher, Quint, Ramaswamy, Rastan, Rath, Reese,

Reiter, Renz, Repenning, Richter, Rick, Riera-Knorrenschild, Ries, Rodepeter, Roeßler, Rogosch, Rost, Roth, Röskam, Röttgers, Ruchholtz, Schales, Schäfer, Schieffer, Schmeck, Schmidt, Schnare, Schneider, Schneyer, Schoner, Schratt, Schrott, Schröder, Schu, Schulze, Schüttler, Schütz, Schwabe, Schwarz, Schwenkel, Schwind, Sahmland, Seifart, Seitz, Seitz, Seipelt, Sekundo, Sesterhenn, Sevinc, Shams-Eldin, Sohlbach, Sommer, Sölter, Stahl, Steinbach-Hund, Steinfeldt, Steinhoff, Steiniger, Steinkamp, Steinmetzer, Stibane, Stiewe, Strassmann, Strik, Strutz, Stuck, Suske, Tackenberg, Tebbe, Teepker, Teymoortash, Theisen, Thiede, Thiemann, Thieme, Timmermann, Timmesfeld, Torossian, Träger, Ulrich, Vassiliou, Viniol, Vogelmeier, Vogt, von Bierbrauer, von Zezschwitz, Vorwerk, Völlger, Wack, Wagner, Wallot, Wanzel, Weber, Weihe, Werdecker, Werlein, Werner, Westerman, Westermann, Westhoff, Wicker, Wiegand, Wilhelm, Wissniowski, Wittig, Wollmer, Wolf, Worzfeld, Wrocklage, Wulf, Yang, Yu, Zavorotnyy, Zemlin, Zentgraf, Ziemek, Ziller, Zink, Ziring, Zoremba, Zovko, Zugmaier, Zwiorek

11 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie - Molekulare Diagnostik der Philipps-Universität Marburg angefertigt. Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Renz dafür, dass ich diese Dissertation an seinem Institut durchführen konnte.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Garn, dem Leiter der Forschungsabteilung des Instituts für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie - Molekulare Diagnostik im Zentrum für Tumor- und Immunbiologie für die freundliche Aufnahme in seiner Abteilung, die wissenschaftliche Betreuung und die konstruktive Besprechung meiner Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Fröbuis! Ich danke ihr für die gewissenhafte Einarbeitung in dieses Projekt, die Betreuung während der experimentellen Durchführung, ihre Diskussionsbereitschaft und die konstruktiven Korrekturen meiner Dissertation.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie - Molekulare Diagnostik und der DRG Instruments GmbH für deren Kooperation und Hilfsbereitschaft bedanken.

Vielen Dank.